

09/636, 289



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 53 176 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 196 53 176.4
㉒ Anmeldetag: 19. 12. 96
㉔ Offenlegungstag: 25. 6. 98

㉕ Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/60
C 12 N 9/88
C 12 N 9/24
C 12 N 15/63
C 12 N 1/00
C 12 N 5/10
A 01 H 5/00
A 01 H 5/10
C 07 K 16/40
C 08 B 31/00
D 06 M 15/11
C 08 B 30/00

DE 196 53 176 A 1

// C12N 15/82,15/11, A23L 1/0522,A01N 25/00,C05G 3/06,A61K 47/36,7/00,7/16

㉗ Anmelder:
PlantTec Biotechnologie GmbH Forschung und
Entwicklung, 14473 Potsdam, DE

㉘ Erfinder:
Herr, Dr.Michael Emmermann, 13351 Berlin, DE;
Herr, Dr.Jens Koßmann, 14476 Golm, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ㉙ Neue Nucleinsäuremoleküle aus Mais und ihre Verwendung zur Herstellung einer modifizierten Stärke
- ㉚ Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die ein Stärkekorn-gebundenes Protein aus Mais codieren, sowie Verfahren und rekombinante DNA-Moleküle zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren. Darüber hinaus werden die aus den Verfahren resultierenden Pflanzenzellen und Pflanzen und die aus ihnen erhältliche Stärke beschrieben.

DE 196 53 176 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein Stärkekorn-gebundenes Protein aus Mais codieren, sowie Verfahren und rekombinante DNA-Moleküle zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren. Die Erfindung betrifft ebenfalls die aus den Verfahren resultierenden transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen und die aus den transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhaltliche Stärke.

Das Polysaccharid Stärke, das einen der wichtigsten Speicherstoffe im Pflanzenreich darstellt, findet neben der Verwendung im Nahrungsmittelbereich auch eine breite Verwendung als nachwachsender Rohstoff für die Herstellung industrieller Produkte. Um die Anwendung dieses Rohstoffes in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es notwendig, eine große Stoffvielfalt und eine Anpassung an die jeweiligen Anforderungen der zu verarbeitenden Industrie zu erreichen.

Obwohl Stärke aus einem chemisch einheitlichen Grundbaustein, der Glucose, aufgebaut ist, stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Es handelt sich dabei eher um ein komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Verzweigungsgrades und des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten unterscheiden. Man unterscheidet insbesondere die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus α -1,4-verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ein Gemisch aus unterschiedlich stark verzweigten Glucoseketten darstellt, wobei die Verzweigungen durch das Auftreten von α -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande kommen.

Die molekulare Struktur der Stärke, die zu einem großen Teil durch den Verzweigungsgrad, das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, die durchschnittliche Kettenlänge sowie das Vorhandensein von Phosphatgruppen bestimmt wird, ist ausschlaggebend für wichtige funktionelle Eigenschaften der Stärke bzw. ihrer wäßrigen Lösungen. Als wichtige funktionelle Eigenschaften sind hierbei beispielsweise zu nennen die Löslichkeit, das Retrogradierungsverhalten, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Farbstabilität, die Verkleisterungseigenschaften, d. h. Binde- und Klebeigenschaften, sowie die Kältestabilität. Auch die Stärkekorngröße kann für verschiedene Anwendungen von Bedeutung sein. Von besonderem Interesse ist insbesondere die Erzeugung von hochamylosehaltigen Stärken. Ferner kann eine in Pflanzenzellen enthaltene modifizierte Stärke das Verhalten der Pflanzenzelle unter bestimmten Bedingungen vorteilhaft verändern. Denkbar ist beispielsweise eine Verringerung des Stärkeabbaus während der Lagerung von Stärke-enthaltenden Organen, wie z. B. Samen oder Knollen, vor deren weiterer Verarbeitung, z. B. zur Extraktion der Stärke. Ferner ist es von Interesse, modifizierte Stärken herzustellen, die dazu führen, daß Pflanzenzellen oder pflanzliche Organe, die diese Stärke enthalten, besser zur Weiterverarbeitung geeignet sind, beispielsweise bei der Herstellung von "Popcorn" oder "Corn flakes" aus Mais oder von Pommes frites, Chips oder Kartoffelpulver aus Kartoffeln. Von besonderem Interesse ist hierbei die Verbesserung der Stärken in der Hinsicht, daß sie ein reduziertes "cold sweetening" aufweisen, d. h. eine verringerte Freisetzung von reduzierenden Zuckern (insbesondere Glucose) bei einer längeren Lagerung bei niedrigen Temperaturen.

Die Anpassung der aus Pflanzen isolierbaren Stärke an bestimmte industrielle Verwendungszwecke erfolgt häufig mit Hilfe chemischer Modifikationen, die in der Regelzeit- und kostenintensiv sind. Es erscheint daher wünschenswert, Möglichkeiten zu finden, Pflanzen herzustellen, die eine Stärke synthetisieren, die in ihren Eigenschaften bereits den Anforderungen der verarbeitenden Industrie entspricht.

Herkömmliche Wege zur Herstellung derartiger Pflanzen bestehen in klassischen Züchtungsverfahren und der Erzeugung von Mutanten. So wurde beispielsweise bei Mais eine Mutante erzeugt, die eine Stärke mit veränderten Viskositätseigenschaften synthetisiert (US Patentschrift 5,331,108), sowie eine Maissorte (waxy maize) durch Züchtung etabliert, deren Stärke zu nahezu 100% aus Amylopektin besteht (Akasaka und Nelson, J. Biol. Chem. 241 (1966), 2280-2285). Ferner sind bei Mais und Erbse Mutanten beschrieben worden, die Stärken mit hohem Amylosegehalt synthetisieren (70% in Mais bzw. bis zu 50% in Erbse). Diese Mutanten sind bisher nicht auf molekularer Ebene charakterisiert worden und erlauben somit auch nicht die Erzeugung entsprechender Mutanten in anderen stärke-speichernden Pflanzen.

Alternativ können Pflanzen, die eine Stärke mit veränderten Eigenschaften synthetisieren, mit Hilfe gentechnischer Verfahren erzeugt werden. Beschrieben wurde beispielsweise in mehreren Fällen die gentechnische Veränderung von Kartoffelpflanzen, mit dem Ziel der Veränderung der in den Pflanzen synthetisierten Stärke (z. B. WO 92/11376; WO 92/14827). Voraussetzung für die Anwendung gentechnischer Verfahren ist jedoch die Verfügbarkeit von DNA-Sequenzen, deren Genprodukte einen Einfluß auf die Stärkesynthese, die Stärkemodifikation oder den Stärkeabbau haben.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Nucleinsäuremoleküle und Verfahren zur Verfügung zu stellen, die es ermöglichen, Pflanzen dahingehend zu verändern, daß sie eine Stärke synthetisieren, die sich hinsichtlich ihrer physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften von natürlicherweise in den Pflanzen synthetisierter Stärke unterscheidet, und die somit für allgemeine und/oder spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst. Die vorliegende Erfindung betrifft somit Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der unter Seq ID No. 6 angegebenen Aminosäuresequenz codieren. Derartige Proteine liegen in den Plastiden pflanzlicher Zellen sowohl an Stärkekörnern gebunden vor, als auch außerhalb von Stärkekörnern in freier, d. h. löslicher Form.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die eine Sequenz mit der unter Seq ID No. 5 angegebenen Nucleotidabfolge, insbesondere die in Seq ID No. 5 angegebenen codierenden Region, umfassen.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein an Mais codieren, das in den Plastiden der Zellen zum Teil an Stärkekörnern gebunden vorliegt, und die mit den oben genannten erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen bzw. deren komplementären Strang hybridisieren. Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet in diesem Zusammenhang eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z. B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken von Mais isoliert werden.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z. B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z. B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Als Hybridisierungsprobe können z. B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 5 angegebene Sequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten DNA-Fragmenten kann es sich auch um synthetische DNA-Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen DNA-Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Sequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erforderlich.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, deren Sequenzen aufgrund des genetischen Codes degeneriert sind im Vergleich zu den Sequenzen der obengenannten Moleküle, und die ein Protein codieren, das in den Plastiden pflanzlicher Zellen teilweise an Stärkekörner gebunden vorliegt.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, die das oben beschriebene Protein codieren. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um das beschriebene Protein zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen dieser Moleküle aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40%, insbesondere eine Identität von mindestens 60%, vorzugsweise über 80% und besonders bevorzugt über 90%. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Nucleinsäuremoleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln.

Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z. B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z. B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität, pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können auch durch dem Fachmann geläufige Synthesetechniken hergestellt werden.

Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen kann es sich sowohl um DNA-, beispielsweise um cDNA oder genomische DNA, als auch um RNA-Moleküle handeln.

Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder Vektor transformiert und/oder genetisch manipuliert sind, sowie Zellen, die von solchen Zellen abstammen und ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder einen Vektor enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um bakterielle Zellen oder um Pflanzenzellen.

Es wurde nun gefunden, daß das durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierte Protein einen Einfluß auf die Stärkesynthese bzw. -modifikation hat, und eine Veränderung der Menge des Proteins in pflanzlichen Zellen zu Veränderungen im Stärkemetabolismus der Pflanzen führt, insbesondere zur Synthese von Stärken mit veränderten physikalischen und chemischen Eigenschaften.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es somit möglich, mit Hilfe gentechnischer Verfahren Pflanzen herzustellen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, die sich in ihrer Struktur und ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften von in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke unterscheidet. Hierzu werden die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle mit regulatorischen Elementen verknüpft, die die Transkription und Translation in Pflanzenzellen gewährleisten, und in pflanzliche Zellen eingebracht.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, die ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten, wobei dieses mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Die regulatorischen Elemente sind vorzugsweise heterolog in Bezug auf das Nucleinsäuremolekül.

Derartige erfindungsgemäße Pflanzenzellen unterscheiden sich von natürlicherweise auftretenden Pflanzenzellen u. a. dadurch, daß sie in ihr Genom integriert mindestens eine Kopie eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls, gegebenenfalls zusätzlich zu den natürlicherweise vorkommenden Kopien enthalten. Ferner ist (sind) diese zusätzliche(n) Kopie(n) an einem Ort im Genom integriert, an dem sie natürlicherweise nicht vorkommen. Dies läßt sich beispielsweise durch eine Southern-Blot-Analyse nachweisen.

Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden.

den. Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d. h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, insbesondere stärkepeichernde Nutzpflanzen, wie z. B. Getreidearten (Roggen, Gerste, Hafer, Weizen etc.), Reis, Mais, Erbse, Maniok und Kartoffel.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Expression bzw. zusätzlichen Expression eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls eine Stärke, die im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen, d. h. nicht-transformierten Pflanzen, modifiziert ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch die aus den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhältliche Stärke.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins, das in pflanzlichen Zellen sowohl an Stärkekörner gebunden als auch in löslicher Form vorliegt, bei dem erfindungsgemäße Wirtszellen unter Bedingungen kultiviert werden, die die Expression des Proteins erlauben, und das Protein aus den Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

Ferner betrifft die Erfindung die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine sowie Proteine, die durch das oben beschriebene Verfahren erhältlich sind. Es handelt sich dabei vorzugsweise um kerncodierte Proteine aus Mais, die in den Plastiden lokalisiert sind. In den Plastiden liegen diese Enzyme sowohl an den Stärkekörnern gebunden vor als auch frei.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Antikörper, die spezifisch ein erfindungsgemäßes Protein erkennen. Es kann sich hierbei sowohl um monoclonale als auch um polyclonale Antikörper handeln. Verfahren zur Herstellung derartiger Antikörper sind dem Fachmann geläufig.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül spezifisch hybridisieren und eine Länge von mindestens 15 Nucleotiden aufweisen. Spezifisch hybridisieren bedeutet dabei, daß unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, keine signifikanten Kreuzhybridisierungen mit Sequenzen auftreten, die für andere Proteine codieren. Vorzugsweise haben derartige Nucleinsäuremoleküle eine Länge von mindestens 20, besonders bevorzugt von mindestens 50 und insbesondere von mindestens 100 Nucleotiden. Verwendet werden können solche Moleküle beispielsweise als PCR-Primer, als Hybridisierungsproben oder als DNA-Moleküle, die antisense-RNA codieren.

Es wurde ferner gefunden, daß es möglich ist, die Eigenschaften der in Pflanzenzellen synthetisierten Stärke dadurch zu beeinflussen, daß die Menge an Proteinen, die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codiert werden, in den Zellen verringert wird. Diese Verringerung kann beispielsweise durch antisense-Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, durch Expression geeigneter Ribozyme oder mittels Cosuppression erfolgen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch DNA-Moleküle, die eine antisense-RNA codieren, die komplementär ist zu Transkripten eines erfindungsgemäßen DNA-Moleküls, sowie diese antisense-Moleküle. Komplementär bedeutet dabei, daß die codierte RNA nicht 100% komplementär sein muß, sondern auch ein geringerer Grad an Komplementarität ausreicht, solange sie genügend hoch ist, um bei Expression in pflanzlichen Zellen die Expression eines erfindungsgemäßen Proteins zu inhibieren. Die transkribierte RNA ist vorzugsweise zumindest 90% und besonders bevorzugt mindestens 95% komplementär zu einem Transkript eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls. Um bei Transkription in pflanzlichen Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken, sind derartige DNA-Moleküle mindestens 15 bp lang, vorzugsweise länger als 100 bp und besonders bevorzugt länger als 500 bp, jedoch in der Regel kürzer als 5000 bp, vorzugsweise kürzer als 2500 bp.

Ferner betrifft die Erfindung auch DNA-Moleküle, die bei Expression in pflanzlichen Zellen zur Synthese einer RNA führen, die in den Pflanzenzellen aufgrund eines Cosuppressions-Effektes eine Verringerung der Expression erfindungsgemäßer Nucleinsäuremoleküle hervorruft, die das beschriebene Protein codieren. Die Erfindung betrifft auch die durch diese codierten RNA-Moleküle. Das Prinzip der Cosuppression sowie die Herstellung entsprechender DNA-Sequenzen ist beispielsweise ausführlich beschrieben in der WO 90/12084. Derartige DNA-Moleküle codieren vorzugsweise eine RNA, die einen hohen Grad an Homologie zu Transkripten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle hat. Es ist dabei allerdings nicht unbedingt erforderlich, daß die codierte RNA in ein Protein translatierbar ist.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung DNA-Moleküle, die ein RNA-Molekül mit Ribozymaktivität codieren, das spezifisch Transkripte eines erfindungsgemäßen DNA-Moleküls spaltet, sowie diese codierten RNA-Moleküle.

Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle, die in der Lage sind, RNA-Moleküle und spezifische Zielsequenzen zu spalten. Mit Hilfe gentechnologischer Methoden ist es möglich, die Spezifität von Ribozymen zu verändern. Es existieren verschiedene Klassen von Ribozymen. Für die praktische Anwendung mit dem Ziel, das Transkript eines bestimmten Gens gezielt zu spalten, werden bevorzugt Vertreter zweier verschiedener Gruppen von Ribozymen verwendet. Die eine Gruppe wird gebildet von Ribozymen, die dem Typ der Gruppen-Intron-Ribozymen zuzuordnen sind. Die zweite Gruppe wird von Ribozymen gebildet, die als charakteristisches Strukturmerkmal ein sogenanntes "hammerhead"-Motiv aufweisen. Die spezifische Erkennung des Ziel-RNA-Moleküls kann modifiziert werden durch Änderung der Sequenzen, die dieses Motiv flankieren. Diese Sequenzen bestimmen über Basenpaarung mit Sequenzen im Zielmolekül die Stelle, an der die katalytische Reaktion und somit die Spaltung des Zielmoleküls erfolgt. Da die Sequenzanforderungen für eine effiziente Spaltung äußerst gering sind, ist es im Prinzip möglich, spezifische Ribozyme für praktisch jedes beliebige RNA-Molekül zu entwickeln.

Um DNA-Moleküle herzustellen, die ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte eines erfindungsgemäßen DNA-Moleküls spaltet, wird beispielsweise eine DNA-Sequenz, die eine katalytische Domäne eines Ribozyms codiert, beiderseits mit DNA-Sequenzen verknüpft, die homolog sind zu Sequenzen des Zielenzyms. Als Sequenzen, die die katalytische Domänen codieren, kommen beispielsweise in Frage die katalytische Domäne der Satelliten-DNA des SCMo-Virus (Davies et al., Virology 177 (1990), 216-224) oder die der Satelliten-DNA des TobR-Virus (Steinecke et al.,

EMBO J. 11 (1992), 1525–1530; Haseloff und Gerlach, Nature 334 (1988), 585–591). Die die katalytische Domäne flankierenden DNA-Sequenzen stammen vorzugsweise aus den oben beschriebenen erfindungsgemäßen DNA-Molekülen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, die die oben beschriebenen DNA-Moleküle enthalten, insbesondere solche, bei denen die beschriebenen DNA-Moleküle verknüpft sind mit regulatorischen Elementen, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die die beschriebenen DNA-Moleküle oder Vektoren enthalten. Die Wirtszelle kann eine prokaryontische, beispielsweise bakterielle, oder eukaryontische Zelle sein. Bei den eukaryontischen Wirtszellen handelt es sich vorzugsweise um pflanzliche Zellen.

Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzenzellen, die ein oben beschriebenes DNA-Molekül enthalten, das eine antisense-RNA, ein Ribozym oder eine RNA, die zu einem Cosuppressions-Effekt führt, codiert, wobei dieses DNA-Molekül verknüpft ist mit DNA-Elementen, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Diese transgenen Pflanzenzellen können nach gängigen Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Die Erfindung betrifft somit auch Pflanzen, die erhältlich sind durch Regeneration aus den beschriebenen transgenen Pflanzenzellen, sowie Pflanzen, die die beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich wiederum um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, vorzugsweise um Nutzpflanzen, insbesondere stärke-speichernde, wie oben angegeben und besonders bevorzugt um Maispflanzenzellen.

Durch die Expression der beschriebenen DNA-Moleküle, die antisense-RNA, ein Ribozym oder eine "Cosuppressions-RNA" codieren, in den transgenen Pflanzenzellen kommt es zu einer Verringerung der Menge an Proteinen, die durch erfindungsgemäße DNA-Moleküle codiert werden, die endogen in den Zellen vorliegen. Diese Verringerung hat überraschenderweise eine drastische Veränderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der in den Pflanzenzellen synthetisierten Stärke zur Folge.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch die aus den beschriebenen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhältliche Stärke.

Ferner betrifft die Erfindung die durch die beschriebenen DNA-Moleküle codierten antisense-RNA-Moleküle, sowie RNA-Moleküle mit Ribozymaktivität und RNA-Moleküle, die einen Cosuppressions-Effekt hervorrufen, die beispielsweise durch Transkription erhältlich sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen, die im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen eine modifizierte Stärke synthetisieren, bei dem in den Pflanzenzellen die Menge an Proteinen verringert wird, die durch erfindungsgemäße DNA-Moleküle codiert werden, die endogen in den Zellen vorliegen.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt diese Verringerung mit Hilfe eines antisense-Effektes. Hierzu werden erfindungsgemäße DNA-Moleküle oder Teile davon in antisense-Orientierung mit einem Promotor verknüpft, der die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleistet, sowie gegebenenfalls mit einem Terminationssignal, das die Termination der Transkription sowie die Polyadenylierung des Transkriptes gewährleistet. Um einen effizienten antisense-Effekt in den pflanzlichen Zellen zu gewährleisten, sollte die synthetisierte antisense-RNA eine Mindestlänge von 15 Nucleotiden, vorzugsweise von mindestens 100 Nucleotiden und besonders bevorzugt von über 500 Nucleotiden aufweisen. Ferner sollte die die antisense-RNA codierende DNA-Sequenz in bezug auf die zu transformierende Pflanzenspezies homolog sein. Es können jedoch auch DNA-Sequenzen verwendet werden, die einen hohen Grad an Homologie zu endogen in den Zellen vorhandenen DNA-Sequenzen aufweisen, vorzugsweise eine Homologie von mehr als 90%, besonders bevorzugt von mehr als 95%.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verringerung der Menge an Proteinen, die durch die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle codiert werden, durch einen Ribozym-Effekt. Die prinzipielle Wirkungsweise von Ribozymen, sowie die Konstruktion von DNA-Molekülen, die derartige RNA-Moleküle codieren, wurden bereits oben beschrieben. Um in transgenen Zellen eine RNA mit Ribozymaktivität zu exprimieren, werden die oben beschriebenen DNA-Moleküle, die für ein Ribozym codieren, mit DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor und einem Terminationssignal. Die in den Pflanzenzellen synthetisierten Ribozyme führen zur Spaltung von Transkripten von erfindungsgemäßen DNA-Molekülen, die endogen in den Zellen vorliegen.

Eine weitere Möglichkeit der Verringerung der Menge an Proteinen, die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codiert werden, ist die Cosuppression. Gegenstand der Erfindung sind dabei auch die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Pflanzenzellen, die dadurch charakterisiert sind, daß bei ihnen die Menge an Proteinen verringert ist, die durch die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle codiert werden, und die im Vergleich zu Wildtyp-Zellen eine modifizierte Stärke synthetisieren.

Ferner betrifft die Erfindung Pflanzen, die erhältlich sind durch Regeneration der beschriebenen Pflanzenzellen, sowie Pflanzen, die die beschriebenen erfindungsgemäßen Zellen enthalten.

Die aus den beschriebenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhältliche Stärke ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Diese unterscheidet sich in ihren physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften von Stärke aus nicht-transformierten Zellen bzw. Pflanzen. Vorzugsweise weist diese Stärke im Vergleich zu Stärke aus nicht-transformierten Zellen bzw. Pflanzen veränderte Verkleisterungseigenschaften, d. h. veränderte Viskositätseigenschaften der wäßrigen Lösungen der Stärke, und/oder einen veränderten Phosphatgehalt, insbesondere einen reduzierten Phosphatgehalt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird in den transformierten Pflanzenzellen nicht nur die Synthese eines erfindungsgemäßen Proteins reduziert, sondern darüber hinaus auch die Synthese mindestens eines weiteren, an der Stärkesynthese und/oder Modifikation beteiligten Enzyms. Bevorzugt sind dabei beispielsweise Stärkekorn-gebundene Stärkesynthasen oder Verzweigungsenzyme.

Die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle kann prinzipiell in allen Pflanzenspezies erfolgen. Von Interesse sind sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen, insbesondere Nutzpflanzen und hierbei bevorzugt stärke-speichernde Pflanzen, wie z. B. Getreidepflanzen (Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, etc.), insbesondere Mais, Reis, Erbse, Maniok und Kartoffel.

Unter dem Begriff "regulatorische DNA-Elemente, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten" werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung DNA-Abschnitte verstanden, die die Initiation bzw. die Termination der Transkription in pflanzlichen Zellen ermöglichen. Zu den DNA-Abschnitten, die die Initiation der Transkription gewährleisten zählen insbesondere Promotoren.

Für die Expression der verschiedenen oben beschriebenen erfindungsgemäßen DNA-Moleküle in Pflanzen kommt im Prinzip jeder in pflanzlichen Zellen funktionale Promotor in Betracht. Der Promotor kann homolog oder heterolog in bezug auf die verwendete Pflanzenspezies sein. Geeignet ist beispielsweise der 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Odell et al., Nature 313 (1985), 810–812), der eine konstitutive Expression in allen Geweben einer Pflanze gewährleistet und das in der WO/9401571 beschriebene Promotorkonstrukt. Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt (siehe beispielsweise WO/9307279) oder in einem bestimmten Gewebe der Pflanze zu einer Expression nachfolgender Sequenzen führen (siehe z. B. Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2245–2251). Präferentiell werden Promotoren eingesetzt, die in den stärkespeichernden Organen der zu transformierenden Pflanzen aktiv sind. Dies sind beim Mais die Maiskörner, während es bei der Kartoffel die Knollen sind. Zur Transformation der Kartoffel kann insbesondere, aber nicht ausschließlich, der knollenspezifische B33-Promotor (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23–29) verwendet werden.

Neben Promotoren können DNA-Abschnitte zur Initiation der Transkription auch DNA-Sequenzen enthalten, die eine weitere Steigerung der Transkription gewährleisten, beispielsweise sogenannte Enhancer-Elemente.

Ferner kann der Begriff "regulatorische DNA-Elemente" auch Terminationssignale umfassen, die der korrekten Beendigung der Transkription sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dienen, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben und sind beliebig austauschbar. Beispiele für derartige Terminationssignale sind die 3'-nichttranslatierten Regionen, die das Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthase-Gens (NOS-Gen) oder des Octopinsynthase-Gens (Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23–29) aus Agrobakterien umfassen, oder die 3'-nichttranslatierten Regionen der Gene der Speicherproteine aus Sojabohne, sowie die der Gene der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase (ssRUBISCO).

Die Einführung erfindungsgemäßer DNA-Moleküle in pflanzliche Zellen erfolgt vorzugsweise unter Verwendung von Plasmiden. Vorzugsweise werden dafür Plasmide verwendet, die eine stabile Integration der eingeführten DNA in das pflanzliche Genom gewährleisten.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Clonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E. coli-Zellen verwendet. Transformierte E.coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium kultiviert, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird nach Standardmethoden wiedergewonnen. Als Analyse-methode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen und Sequenzanalysen eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid DNA gespalten werden und resultierende DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z. B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünscht er Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z. B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al., Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181–187). Die zur Transformation der Agrobakterien verwendeten Plasmide enthalten weiterhin ein Selektionsmarkergen, beispielsweise das NPT II-Gen, das die Selektion transformierter Bakterien erlaubt. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdruck Kanthers B.V., Alblasserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1–46 und An et al., EMBO J. 4 (1985), 277–287 beschrieben worden. Binäre Vektoren sind bereits z. T. kommerziell erhältlich, z. B. pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc., USA).

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z. B. Blatt-

stücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z. B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes, die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z. B. WO95/06128, EP 0 513 849; EP 0 465 875). In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable) granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden können. Shillito et al. (Bio/Technology 7 (1989), 581) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regenerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende Protoplastenkultur, mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu regenerieren, herstellbar ist. Nach einer in vitro Kultivierungszeit von 7 bis 8 Monaten erhalten Shillito et al. Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen, die jedoch Abnormalitäten in der Morphologie und der Reproduktivität aufweisen.

Prioli und Söndahl (Bio/Technology 7 (1989), 589) beschreiben die Regeneration und die Gewinnung fertiler Pflanzen aus Mais-Protoplasten der Cateto Mais-Inzuchtlinie Cat 100-1. Die Autoren vermuten, daß die Protoplasten-Regeneration zu fertilen Pflanzen abhängig ist von einer Anzahl verschiedener Faktoren, wie z. B. von Genotyp, vom physiologischen Zustand der Donor-Zellen und von den Kultivierungsbedingungen. Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u. a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen bzw. Pflanzen erhaltliche Stärke eignet sich aufgrund ihrer Eigenschaften neben den bereits oben angesprochenen speziellen Verwendungszwecken für verschiedene industrielle Verwendungen.

Grundsätzlich läßt sich Stärke in zwei große Kategorien unterteilen, die Hydrolyseprodukte der Stärke und die sogenannten nativen Stärken. Zu den Hydrolyseprodukten zählen im wesentliche die über enzymatische oder chemische Verfahren erhaltene Glucose sowie Glucosebausteine, die für weitere Prozesse, wie Fermentation, oder auch weitere chemische Modifikationen eingesetzt werden können. In diesem Bereich kann die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens, wie es gegenwärtig im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase verläuft, von Bedeutung sein. Darunter läßt sich vorstellen, daß ein geringerer Einsatz von für die Hydrolyse eingesetzten Enzymen durch Veränderung der Struktur der Stärke, z. B. größere Oberfläche des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder sterische, die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme limitierende Struktur, zu einer Kosteneinsparung führen kann.

Die Verwendungen der sogenannten nativen Stärken, die wegen ihrer polymeren Struktur eingesetzt werden, lassen sich in zwei große Bereiche unterteilen:

(a) Verwendung im Nahrungsmittelbereich

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z. B. anorganischen oder organischen Ionen.

(b) Einsatz im Nicht-Nahrungsmittelbereich

Der andere große Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff bei unterschiedlichen Herstellungsprozessen bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten. Der wesentliche Einsatzbereich für die Verwendung von Stärke als Hilfsstoff ist zum einen die Papier- und Pappeindustrie. Stärke wird dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbildung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung

5 rung eingesetzt. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden.

5 Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißgrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich ist der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität wichtig. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfluß von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprüh-

10 bereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung. Ein großer Einsatzbereich besteht beispielsweise in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90% der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den

15 Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln oder Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungseleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt. Eine weitere mögliche Verwendung als Hilfsmittel und Zusatzstoff besteht bei der Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der

20 Stärke als Schlichtmittel, d. h. als Hilfsstoff zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, als Mittel zur Textilaufkräftung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne. Ferner kann die Stärke als Zusatz bei Baustoffen verwendet werden. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskarton-

25 platten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton kann die Stärke zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt werden. Ferner bietet sich die Stärke zur Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus Stärke

30 und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen. Ferner kann die Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate verwendet werden. So werden Stärken beispielsweise zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt.

35 Ein wichtiges Einsatzgebiet besteht ferner im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin eignet sich die Stärke als Tablettensprengmittel, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbiert und nach kurzer Zeit so weit quillt, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder sind weitere Anwendungsmöglichkeiten. Im Bereich der Kosmetik kann die Stärke beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt werden. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

45 Auch die Verwendung der Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Briketts ist denkbar. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6%, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5%. Desweiteren eignet sich die Stärke als Bindemittel, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

50 Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-versetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, re-

55 hydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen. In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens. Dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut. Ebenso kann sie für die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks eingesetzt werden.

60 Eine weitere Einsatzmöglichkeit der modifizierten Stärke besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozeß (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

65 Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyethylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch

Coexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem "master batch" kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyethylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung der Stärke in Polyethylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wäßrigen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärke gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Möglich ist nicht nur die Produktentwicklung von Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen sind mit einem Stärkegehalt von über 50% herzustellen. Ferner weisen die Stärke/Polymermischungen den Vorteil auf, daß sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin aufgrund ihres extremen Wasserbindungsvermögens Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Diese Superabsorber werden hauptsächlich im Hygienebereich verwendet, z. B. bei Produkten wie Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z. B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz der neuen gentechnischen veränderten Stärke sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallisation, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgenden Merkmalen münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur, Transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität. Besonders hervorzuheben ist ferner die Viskosität.

Ferner kann die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen bzw. Pflanzen erhaltene modifizierte Stärke weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt oder zu neuen Einsatzgebieten. Diese chemischen Modifikationen sind dem Fachmann grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch

- Säurebehandlung
- Oxidation
- Veresterung (Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden.)
- Erzeugung von Stärkeethern (Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether)
- Erzeugung von vernetzten Stärken
- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten.

Gegenstand der Erfindung ist auch Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, wie z. B. Samen, Früchte, Stecklinge, Knollen oder Wurzelstöcke, wobei dieses erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthält.

Hinterlegungen

Folgende im Rahmen der vorliegenden Erfindung hergestellten und/oder verwendeten Plasmide wurden bei der als internationale Hinterlegungsstelle anerkannten Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, entsprechend den Anforderungen des Budapest-Vertrages für die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung hinterlegt. (Hinterlegungsnummer; Hinterlegungsdatum):

Plasmid pBinAR Hyg:	(DSM 9505) (20.10.1994)
Plasmid p33-anti-BE:	(DSM 6146) (20.08.1990)
Plasmid pRL2:	(DSM 10225) (04.09.1995)

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt das Plasmid p35S-anti-RL.

Aufbau des Plasmids:

A = Fragment A: CaMV 35S-Promotor, nt 6909-7437 (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294)

B = Fragment B: ca. 1949 bp-langes Asp718-Fragment aus pRL1

Orientierung zum Promotor: anti-sense

Der Pfeil gibt die Richtung des offenen Leserasters an.

C = Fragment C: nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846).

Fig. 2 zeigt das Plasmid pB33-anti-RL.

Aufbau des Plasmids:

A = Fragment A: B33-Promotor des Patatin-Gens B33 aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29)

5 B = Fragment B: ca. 1949 bp-langes Asp7,18-Fragment aus pRL1

Orientierung zum Promotor: anti-sense

Der Pfeil gibt die Richtung des offenen Leserasters an.

C = Fragment C: nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846).

10 **Fig. 3** zeigt eine mit einem Brabender-Viskograph vom Typ Viskograph E aufgezeichnete Brabender-Kurve einer wäßrigen Lösung von Stärke, die aus nicht-transformierten Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée isoliert wurde (siehe Beispiel 8).

Dabei bedeuten:

Drehm. = Drehmoment

[BE] = Brabender-Einheiten

15 Temp. = Temperatur

A = Verkleisterungsbeginn

B = Maximale Viskosität

C = Start der Haltezeit

D = Start der Kühlzeit

20 E = Ende der Kühlzeit

F = Ende der End-Haltezeit.

Die blaue Linie gibt die Viskosität an; die rote den Temperaturverlauf.

25 **Fig. 4** zeigt eine mit einem Brabender-Viskograph vom Typ Viskograph E aufgezeichnete Brabender-Kurve einer wäßrigen Lösung von Stärke, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurde, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL transformiert worden waren (siehe Beispiel 8). Für die Bedeutung der Abkürzungen siehe **Fig. 3**.

Fig. 5 zeigt eine mit einem Brabender-Viskograph vom Typ Viskograph E aufgezeichnete Brabender-Kurve einer wäßrigen Lösung von Stärke aus Kartoffeln, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren (siehe Beispiel 8). Für die Bedeutung der Abkürzungen siehe **Fig. 3**.

30 **Fig. 6** zeigt mit einem Rapid Visco Analyser aufgezeichnete Kurven wäßriger Stärkelösungen, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurden (siehe Beispiel 12). Die rote Linie gibt den Temperaturverlauf an, die blauen Linien 1, 2, 3 und 4 die Viskositäten folgender Stärkelösungen:

Linie 1: Stärke, die aus Wildtyppflanzen isoliert worden ist,

Linie 2: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, bei denen das Verzweigungsenzym alleine inhibiert wurde (vgl. Beispiel 1 der Patentanmeldung WO92/14827),

35 Linie 3: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, bei denen lediglich die erfindungsgemäßen Proteine in ihrer Konzentration verringert wurden (vgl. Beispiel 6)

Linie 4: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid p35SH-anti-BE (vgl. Beispiel 12) transformiert worden sind.

40 **Fig. 7** zeigt mit einem Rapid Visco Analyser aufgezeichnete Kurven wäßriger Stärkelösungen, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurden (siehe Beispiel 13). Die rote Linie gibt den Temperaturverlauf an, die blauen Linien 1, 2, 3 und 4 die Viskositäten folgender Stärkelösungen:

Linie 1: Stärke, die aus Wildtyppflanzen isoliert worden ist,

Linie 2: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, die allein mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI isoliert wurde (sog. waxy-Kartoffel),

45 Linie 3: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, die allein mit dem Plasmid p35S-anti-RL transformiert wurde (vgl. Beispiel 6),

Linie 4: Stärke, die aus Pflanzen isoliert worden ist, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI (vgl. Beispiel 13) transformiert worden sind.

Fig. 8 zeigt das Plasmid pRL2, das eine Volllänge-cDNA aus Kartoffel enthält, die ein R1-Enzym codiert.

50 Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Verwendete Medien und Lösungen

Elutionspuffer

55 25 mM Tris pH 8,3

250 mM Glycin

Dialysepuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,0

60 50 mM NaCl

2 mM EDTA

14,7 mM β -Mercaptoethanol

0,5 mM PMSF

65 Proteinpuffer

50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2

10 mM EDTA

0,5 mM PMSF

14,7 mM β -Mercaptoethanol

Lugolsche Lösung

12 g KI

6 g I₂

ad 1,8 l mit ddH₂O

5

20×SSC

175,3 g NaCl

88,2 g Natrium-Citrat

ad 1000 ml mit ddH₂O

pH 7,0 mit 10 N NaOH

10

10×MEN

200 mM MOPS

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

pH 7,0

15

NSEB-Puffer

0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2

7% SDS

1 mM EDTA

1% BSA (w/v)

20

YT

8 g Bacto-Yeast extract

5 g Bacto-Tryptone

5 g NaCl

ad 1000 ml mit ddH₂O

25

30

Protoplastenisolierungsmedium (100 ml)

Cellulase Onozuka R S (Meiji Seika, Japan)

800 mg

Pectolyase Y 23

40 mg

KNO₃

200 mg

KH₂PO₄

136 mg

K₂HPO₄

47 mg

CaCl₂ 2H₂O

147 mg

MgSO₄ 7H₂O

250 mg

Rinderserumalbumin (BSA)

20 mg

Glucose

4000 mg

Fructose

4000 mg

Saccharose

1000 mg

pH

5,8

Osmolarität

660 mosm.

40

45

Protoplastenwaschlösung 1: wie Protoplastenisolierlösung, aber ohne Cellulase, Pectolyase und BSA.

50

Transformationspuffer

a) Glucose

0,5 M

MES

0,1%

MgCl₂ 6H₂O

25 mM

pH

5,8

auf 600 mosm. einstellen

55

60

b) PEG 6000-Lösung

Glucose

0,5 M

MgCl₂ 6H₂O

100 mM

Hepes

20 mM

pH

6,5

65

Dem obigen Puffer unter b) wird PEG 6000 kurz vor Gebrauch der Lösung zugesetzt (40 Gew.-% PEG). Die Lösung

wird durch ein 0,45 µm Sterilfilter filtriert.

W5 Lösung

5	CaCl ₂	125 mM
	NaCl	150 mM
	KCl	5 mM
	Glucose	50 mM

10 Protoplasten-Kulturmedium (Angaben in mg/l)

	KNO ₃	3000
	(NH ₄) ₂ SO ₄	500
	MgSO ₄ 7H ₂ O	350
15	KH ₂ PO ₄	400
	CaCl ₂ 2H ₂ O	300

Fe-EDTA und Spurenelemente wie im Murashige-Skoog-Medium (Physiol. Plant, 15 (1962), 473).

20	m-Inosit	100
	Thiamin HCl	1.0
	Nicotinsäureamid	0.5
	Pyridoxin HCl	0.5
	Glycin	2.0
25	Glucuronsäure	750
	Galacturonsäure	750
	Galactose	500
	Maltose	500
	Glucose	36 000
30	Fructose	36 000
	Saccharose	30 000
	Asparagin	500
	Glutamin	100
	Prolin	300
35	Caseinhydrolysat	500
	2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	0.5
	pH	5.8
	Osmolarität	600 mosm.

40	Puffer A
	2x SSC
	10x Denhardts-Lösung
	0,1% SDS
	5 mM EDTA
45	50 mM Dinatrium-Phosphat
	250 µg/ml Heringssperma-DNA.

In den Beispielen wurden folgende Standardtechniken angewendet:

1. Clonierungsverfahren

Zur Clonierung in E.coli wurde der Vektor pBluescriptSK verwendet.

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221–230) und B33-Hyg cloniert.

2. Bakterienstämme

Für den pBluescript-Vektor und für die pBinAR- und B33-Hyg-Konstrukte wurde der E.coli-Stamm DH5α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet.

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen wurde mit Hilfe des Agrobacterium tumefaciens-Stammes C58C1 pGV2260 durchgeführt (Deblaere et al., Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777: 4788).

3. Transformation von Agrobacterium tumefaciens

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen & Willmitzer (Nucleic Acids Res. 16 (1988), 9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim & Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513–1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

4. Transformation von Kartoffeln

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L.cv. Désirée) wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige & Skoog, *Physiol. Plant.* 15 (1962), 473–497) mit 2% Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthält. Nach 3–5minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glucose, 5 mg/l Naphthyllessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin bzw. 1 mg/l Hygromycin B, und 0,80% Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glucose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20 mg/l Naphthyllessigsäure, 20 mg/l Gibberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin bzw. 3 mg/l Hygromycin B, und 0,80% Bacto Agar gelegt.

5. Transformation von Mais

(a) Herstellung von Protoplasten der Zelllinie DSM 6009

Protoplastenisolierung

2–4 Tage, vorzugsweise 3 Tage nach dem letzten Mediumswechsel einer Protoplastensuspensionskultur wird das Flüssigmedium abgesaugt und die zurückbleibenden Zellen mit 50 ml Protoplastenwaschlösung 1 gespült und nochmals trockengesaugt. Zu jeweils 2 g der geernteten Zellmasse wird 10 ml Protoplastenisolierungsmedium gegeben. Die resuspendierten Zellen und Zellaggregate werden bei $27 \pm 2^\circ\text{C}$ unter leichtem Schütteln (30 bis 40 rpm) 4 bis 6 h im Dunkeln inkubiert.

Protoplastenreinigung

Sobald die Freisetzung von mindestens 1 Mio. Protoplasten/ml erfolgt ist (mikroskopische Beobachtung), wird die Suspension durch ein Edelstahl- und Nylonsieb von 200 bzw. 45 µm Maschenweite gesiebt. Die Kombination eines 100 µm und eines 60 µm Siebs ermöglicht die Abtrennung der Zellaggregate genauso gut. Das protoplastenhaltige Filtrat wird mikroskopisch beurteilt. Üblicherweise enthält es 98–99% Protoplasten. Der Rest sind unverdaute Einzelzellen. Protoplastenpräparationen mit diesem Reinheitsgrad werden ohne zusätzliche Gradientenzentrifugation für Transformationsexperimente verwendet. Durch Zentrifugation (100 UpM im Aufschwingrotor (100 × g, 3 min) werden die Protoplasten sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und die Protoplasten in Waschlösung 1 resuspendiert. Die Zentrifugation wird wiederholt und die Protoplasten danach im Transformationspuffer resuspendiert.

(b) Protoplastentransformation

Die in Transformationspuffer resuspendierten Protoplasten werden bei einem Titer von $0,5\text{--}1 \times 10^6$ Protoplasten/ml in 10 ml Portionen in 50 ml Polyallomer-Röhrchen eingefüllt. Die zur Transformation verwendete DNA wird in Tris-EDTA (TE) Puffer gelöst. Pro ml Protoplastensuspension werden 20 µg Plasmid-DNA zugegeben. Als Vektor wird dabei ein Phosphinotricinresistenz vermittelndes Plasmid verwendet (vgl. z. B. EP 0 513 849). Nach der DNA-Zugabe wird die Protoplastensuspension vorsichtig geschüttelt, um die DNA homogen in der Lösung zu verteilen. Sofort danach wird tropfenweise 5 ml PEG-Lösung zugetropft.

Durch vorsichtiges Schwenken der Röhrchen wird die PEG-Lösung homogen verteilt. Danach werden nochmals 5 ml PEG-Lösung zugegeben und das homogene Durchmischen wiederholt. Die Protoplasten verbleiben 20 min der PEG-Lösung bei $\pm 2^\circ\text{C}$. Danach werden die Protoplasten durch 3-minütiges Zentrifugieren (100 g; 1000 Upm) sedimentiert. Der Überstand wird verworfen. Die Protoplasten werden durch vorsichtiges Schütteln in 20 ml WS-Lösung gewaschen und danach erneut zentrifugiert. Danach werden sie in 20 ml Protoplastenkulturmmedium resuspendiert, nochmals zentrifugiert und erneut in Kulturmedium resuspendiert. Der Titer wird auf $6\text{--}8 \times 10^5$ Protoplasten/ml eingestellt und die Protoplasten in 3 ml Portionen in Petrischalen (Ø 60 mm, Höhe 15 mm) kultiviert. Die mit Parafilm versiegelten Petrischalen werden bei $25 \pm 2^\circ\text{C}$ im Dunkeln aufgestellt.

(c) Protoplastenkultur

Während der ersten 2–3 Wochen nach der Protoplastenisolierung und -transformation werden die Protoplasten ohne Zugabe von frischem Medium kultiviert. Sobald sich die aus den Protoplasten regenerierten Zellen zu Zellaggregaten mit mehr als 20–50 Zellen entwickelt haben, wird 1 ml frisches Protoplastenkulturmmedium zugegeben, das als Osmoticum Saccharose (90 g/l) enthält.

(d) Selektion transformierter Maiszellen und Pflanzenregeneration

3–10 Tage nach der Zugabe von frischem Medium können die aus Protoplasten entstandenen Zellaggregate auf Agar-Medien mit 100 mg/l L-Phosphinotricin plattiert werden. N6-Medium mit den Vitaminen des Protoplastenkulturmmediums, 90 g/l Saccharose und 1,0 mg/l 2,4D ist ebenso geeignet wie ein analoges Medium beispielsweise mit den Makro- und Mikronährsalzen des MS-Mediums (Murashige und Skoog (1962), siehe oben).

Auf dem Selektivmedium können die aus stabil transformierten Protoplasten hervorgegangenen Kalli ungehindert weiterwachsen. Nach 3–5 Wochen, vorzugsweise 4 Wochen können die transgenen Kalli auf frisches Selektionsmedium transferiert werden, welches ebenfalls 100 mg/l L-Phosphinotricin enthält, das aber kein Auxin mehr enthält. Innerhalb

von 3–5 Wochen differenzieren ca. 50% der transgenen Maiskalli, die das L-Phosphinothricinacetyltransferase-Gen in ihr Genom integriert haben, auf diesem Medium in Gegenwart von L-Phosphinothricin erste Pflanzen.

(e) Aufzucht transgener Regeneratpflanzen

Das embryogene transformierte Maisgewebe wird auf hormonfreiem N6-Medium (Chu C.C. et al., Sci. Sin. 16 (1975), 659) in Gegenwart von 5×10^{-4} M L-Phosphinothricin kultiviert. Auf diesem Medium entwickeln sich Maisembryonen, die das Phosphinothricinacetyltransferase-Gen (PAT-Gen) hinreichend stark exprimieren, zu Pflanzen. Nicht transformierte Embryonen oder solche mit nur sehr schwacher PAT-Aktivität sterben ab. Sobald die Blätter der in vitro-Pflanzen eine Länge von 4–6 mm erreicht haben, können diese in Erde transferiert werden. Nach Abwaschen von Agarresten an den Wurzeln werden die Pflanzen in ein Gemisch von Lehm, Sand, Vermiculit und Einheitserde im Verhältnis 3 : 1 : 1 : 1 gepflanzt und während der ersten 3 Tage nach dem Verpflanzen bei 90–100% relativer Luftfeuchte an die Erdkultur adaptiert. Die Anzucht erfolgt in einer Klimakammer mit 14 h Lichtperiode ca. 25000 Lux in Pflanzenhöhe bei einer Tag/Nachttemperatur von $23 \pm 1/17 \pm 1^\circ\text{C}$. Die adaptierten Pflanzen werden bei einer Luftfeuchte von $65 \pm 5\%$ kultiviert.

6. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

7. Northern Blot-Analyse

RNA wurde nach Standardprotokollen aus Blattgewebe von Pflanzen isoliert. 50 µg der RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (1,5% Agarose, $1 \times$ MEN-Puffer, 16,6% Formaldehyd). Das Gel wurde nach dem Gellauf kurz in Wasser gewaschen. Die RNA wurde mit $20 \times$ SSC mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran vom Typ Hybond N (Amersham, UK) transferiert. Die Membran wurde anschließend bei 80°C unter Vakuum für zwei Stunden gebacken. Die Membran wurde in NSEB-Puffer für 2 h bei 68°C prähybridisiert und anschließend in NSEB-Puffer über Nacht bei 68°C in Gegenwart der radioaktiv markierten Probe hybridisiert.

8. Pflanzenhaltung

Kartoffelpflanzen wurden im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen gehalten:

Lichtperiode: 16 h bei 25000 Lux und 22°C

Dunkelperiode: 8 h bei 15°C

Luftfeuchte: 60%.

9. Bestimmung des Amylose/Amylopektinverhältnisses in Stärke aus Kartoffelpflanzen

Stärke wurde nach Standardmethoden aus Kartoffelpflanzen isoliert und das Verhältnis Amylose zu Amylopektin nach der von Hovenkamp-Hermelink et al. beschriebenen Methode (Potato Research 31 (1988) 241–246) bestimmt.

10. Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose

Zur Bestimmung des Glucose-, Fructose- bzw. Saccharosegehalts werden kleine Knollenstücke (Durchmesser ca. 10 mm) von Kartoffelknollen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 30 min bei 80°C in 0,5 ml 10 mM HEPES, pH 7,5; 80% (Vol./Vol.) Ethanol extrahiert. Der Überstand, der die löslichen Bestandteile enthält, wird abgenommen und das Volumen bestimmt. Der Überstand wird zur Bestimmung der Menge an löslichen Zuckern verwendet. Die quantitative Bestimmung von löslicher Glucose, Fructose und Saccharose wird in einem Ansatz mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

100,0 mM Imidazol/HCl, pH 6,9

1,5 mM MgCl_2

0,5 mM NADP^+

1,3 mM ATP

10–50 µl Probe

1,0 U Glucose-6-Phosphatdehydrogenase aus Hefe.

Der Ansatz wird für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Zucker erfolgt anschließend mittels gängiger photometrischer Methoden durch Messung der Absorption bei 340 nm nach der aufeinanderfolgenden Zugabe von:

1,0 Einheiten Hexokinase aus Hefe (zur Bestimmung von Glucose)

1,0 Einheiten Phosphoglucosomerase aus Hefe (zur Bestimmung von Fructose) und

1,0 Einheiten Invertase aus Hefe (zur Bestimmung von Saccharose).

Beispiel 1

Isolierung Stärkekorn-gebundener Proteine aus Kartoffelstärke

Die Isolierung von Stärkekorn-gebundenen Proteinen aus Kartoffelstärke erfolgte durch Elektroelution in einer Elutionsvorrichtung, die analog zu dem "Model 422 Electro-Eluter" (BIORAD Laboratories Inc., USA) konstruiert war, aber

ein wesentlich größeres Volumen aufwies (ca. 200 ml). Es wurden 25 g getrocknete Stärke in Elutionspuffer aufgenommen (Endvolumen 80 ml). Die Stärke stammte aus Kartoffeln, die aufgrund der anti-sense-Expression einer DNA-Sequenz, die für die Stärkekorngewundene Stärkesynthase I (GBSS I) aus Kartoffel codiert, eine nahezu amylosefreie Stärke produzieren. Die Suspension wurde im Wasserbad auf 70–80°C erwärmt. Anschließend wurden 72,07 g Harnstoff zugegeben (Endkonzentration 8 M) und das Volumen mit Elutionspuffer auf 180 ml aufgefüllt. Die Stärke löste sich unter ständigem Rühren und bekam eine kleisterartige Konsistenz. Die Proteine wurden aus der Lösung mit Hilfe der Elutionsvorrichtung über Nacht elektroeluiert (100 V; 50–60 mA). Die eluierten Proteine wurden vorsichtig aus der Apparatur entnommen. Schwebstoffe wurden durch kurze Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde 2–3 mal je eine Stunde bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert. Anschließend wurde das Volumen der Proteinlösung bestimmt. Die Proteine wurden durch Zugabe von Ammoniumsulfat (90% Endkonzentration) gefällt. Die Zugabe erfolgte unter ständigem Rühren bei 0°C. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation pelletiert und in Proteinpuffer aufgenommen.

Beispiel 2

Identifizierung und Isolierung von cDNA-Sequenzen die Stärkekorn-gebundene Proteine codieren

Die gemäß Beispiel 1 isolierten Proteine wurden zur Herstellung von polyclonalen Antikörpern aus Kaninchen verwendet, die spezifisch Stärkekorn-gebundene Proteine erkennen. Mit Hilfe derartiger Antikörper wurde anschließend nach Standardmethoden eine cDNA-Expressionsbibliothek nach Sequenzen durchgemustert, die für Stärkekorn-gebundene Proteine codieren.

Die Expressionsbibliothek wurde folgendermaßen hergestellt:

Aus Kartoffelknollen der Kartoffelvarietät "Berolina" wurde nach Standardmethoden poly(A⁺)-mRNA isoliert. Ausgehend von der poly(A⁺)-mRNA wurde nach der Methode von Gubler und Hoffmann (Gene 25 (1983), 263–269) unter Verwendung eines Xho I-Oligo d(t)₁₈-Primers cDNA hergestellt. Diese wurde nach EcoR I-Linkeraddition mit Xho I nachgeschnitten und orientiert in einen mit EcoR I und Xho I geschnittenen Lambda ZAP II-Vektor (Stratagene) ligiert. Ca. 500.000 Plaques einer derart konstruierten cDNA-Bibliothek wurden nach Sequenzen durchgemustert, die von polyclonalen Antikörpern, die gegen Stärkekorn-gebundene Proteine gerichtet sind, erkannt wurden.

Zur Analyse der Phagenplaques wurden diese auf Nitrozellulosefilter übertragen, die vorher für 30–60 min in einer 10 mM IPTG-Lösung inkubiert und anschließend auf Filterpapier getrocknet wurden. Der Transfer erfolgte für 3 h bei 37°C. Anschließend werden die Filter für 30 min bei Raumtemperatur in Blockreagenz inkubiert und zweimal für 5–10 min in TBST-Puffer gewaschen. Die Filter wurden mit den gegen Stärkekorn-gebundene Proteine gerichteten polyclonalen Antikörpern in geeigneter Verdünnung für 1 h bei Raumtemperatur oder für 16 h bei 4°C geschüttelt. Die Identifizierung von Plaques, die ein Protein exprimierten, das von den polyclonalen Antikörpern erkannt wurde, erfolgte mit Hilfe des "Blotting detection kit for rabbit antibodies RPN 23" (Amersham UK) nach den Angaben des Herstellers.

Phagenclone der cDNA-Bibliothek, die ein Protein exprimierten, das von den polyclonalen Antikörpern erkannt wurde, wurden unter Anwendung von Standardverfahren weiter gereinigt.

Mit Hilfe der in-vivo-excision-Methode wurden von positiven Phagenclonen E. coli-Clone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBluescript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertionen wurde ein geeigneter Clon, pRL1, weiter analysiert.

Beispiel 3

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pRL1

Aus einem entsprechend Beispiel 2 erhaltenen E. coli-Clon wurde das Plasmid pRL1 isoliert und ein Teil der Sequenz seiner cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxynucleotidmethode (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463–5467) bestimmt. Die Insertion ist ca. 2450 bp lang. Ein Teil der Nucleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist unter Seq ID No. 3 und Seq ID No. 4 angegeben.

Eine Sequenzanalyse und ein Sequenzvergleich mit bekannten DNA-Sequenzen zeigte, daß die unter Seq ID No. 3 dargestellte Sequenz neu ist und keine signifikante Homologie zu bisher bekannten DNA-Sequenzen aufweist. Die Sequenzanalyse zeigte weiterhin, daß es sich bei der cDNA-Insertion nur um eine partielle cDNA handelt, bei der ein Teil der codierenden Region am 5'-Ende fehlt.

Beispiel 4

Identifizierung und Isolierung einer vollständigen cDNA die ein Stärkekorn-gebundenes Protein aus Solanum tuberosum codiert

Zur Isolierung einer, der partiellen cDNA-Insertion des Plasmids pRL1 entsprechenden, vollständigen cDNA, wurde eine weitere cDNA-Bibliothek hergestellt. Dabei handelte es sich um eine Schließzellen-spezifische cDNA-Bibliothek aus Solanum tuberosum, die folgendermaßen konstruiert wurde:

Zunächst wurden Epidermisfragmente von Blättern von Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée im wesentlichen nach der Methode von Hedrich et al. (Plant Physiol. 89 (1989), 148) hergestellt, indem ca. 60 Blätter von sechs Wochen alten, im Gewächshaus gehaltenen Kartoffelpflanzen geerntet wurden. Aus den Blättern wurde die Mittelrippe entfernt. Anschließend wurden die Blätter in einem großen "Waring blender" (Volumen 1 Liter) in gekühltem destilliertem H₂O viermal für je 15 Sekunden auf höchster Stufe zerkleinert. Die Suspension wurde durch ein Nylonsieb mit einer Porengröße von 220 µm (Nybolt, Zürich, Schweiz) filtriert und mehrmals mit kaltem destilliertem Wasser gewaschen. Die Suspension wurde wiederum durch ein 220 µm-Nylonsieb filtriert und ausgiebig mit kaltem destilliertem Wasser gewaschen. Der Rück-

stand (Epidermisfragmente) wurde in einen kleineren "Waring blender" (Volumen 250 ml) gegeben und in destilliertem Wasser und Eis viermal für je 15 Sekunden bei auf kleiner Stufe zerkleinert. Die Suspension wurde durch ein 220 µm-Nylonsieb filtriert und ausgiebig mit kaltem destilliertem Wasser gewaschen. Die Epidermisfragmente (Rückstand) wurden mikroskopisch hinsichtlich einer Kontamination durch Mesophyllzellen untersucht. Wenn dies der Fall war, wurde der Zerkleinerungsschritt im kleinen "Waring blender" wiederholt.

Der Aufschluß der Schließzellen der Epidermisfragmente erfolgte durch Zermörsern in flüssigem Stickstoff in einem gekühlten Mörser für ca. 2 h. Zur Überprüfung des Aufschlusses der Schließzellen wurden regelmäßig Proben genommen und mikroskopisch überprüft. Nach 2 h oder wenn eine genügend große Anzahl von Schließzellen aufgeschlossen wurde, wurde das entstandene Pulver in ein Reaktionsgefäß (Volumen 50 ml) überführt und in einem Volumen GTC-Puffer (Chirgwin et al., Biochem. 18 (1979), 5294–5299) aufgenommen. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand durch Miracloth (Calbiochem, La Jolla, Kalifornien) filtriert. Das Filtrat wurde wie in Glisin et al. (Biochemistry 13 (1974), 2633–2637) und Mornex et al. (J. Clin. Inves. 77 (1986), 1952–1961) für 16 h einer Ultrazentrifugation unterzogen. Nach der Zentrifugation wurde der RNA-Niederschlag in 250 µl TC-Puffer aufgenommen. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,05 Volumen 1 M Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol gefällt. Die RNA wurde abzentrifugiert und der Niederschlag mit 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 70% Ethanol gewaschen. Die RNA wurde kurz getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

Aus der isolierten RNA wurde nach Standardverfahren poly A⁺-RNA isoliert. Ausgehend von der poly(A⁺)-mRNA wurde nach der Methode von Gubler und Hoffmann (Gene 25 (1983), 263–269) unter Verwendung eines Xho I-Oligo d(t)₁₈-Primers cDNA hergestellt. Diese wurde nach EcoR I-Linkeraddition mit Xho I nachgeschnitten und orientiert in einen mit EcoR I und Xho I geschnittenen Lambda ZAP II-Vektor (Stratagene, GmbH, Heidelberg, Deutschland) ligiert. Das Verpacken in Phagenköpfe erfolgte unter Verwendung des Gigapack II Gold kit's (Stratagene, GmbH, Heidelberg, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers.

Aus einer derartigen cDNA-Bibliothek wurden nach Standardverfahren Phagenclone isoliert und gereinigt, die mit der cDNA-Insertion aus dem Plasmid pRL1 hybridisieren. Mit Hilfe der in-vivo-excision-Methode wurden von positiven Phagenclonen E. coli-Clone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBluescript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertionen wurden geeignete Clone einer Restriktionskartierung und einer Sequenzanalyse unterzogen. Aus einem geeigneten Clon wurde das Plasmid pRL2 (DSM 10225) isoliert, das eine vollständige cDNA enthält, die ein Stärkekorn-gebundenes Protein aus Kartoffel codiert.

Beispiel 5

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pRL2

Die Nucleotidsequenz der cDNA-Insertion des Plasmids pRL2 wurde wie in Beispiel 3 beschrieben bestimmt. Die Insertion ist 4856 bp lang. Die Nucleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Seq ID No. 1 bzw. Seq ID No. 2 angegeben. Das entsprechende Gen wird im folgenden RL-Gen genannt. Das durch die codierende Region codierte Protein wird im folgenden als R1-Enzym bezeichnet.

Beispiel 6

Konstruktion des Plasmids p35S-anti-RL und Einführung des Plasmids in das Genom von Kartoffelpflanzen

Aus dem Plasmid pRL1 wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuclease Asp718 ein ca. 1800 bp langes DNA-Fragment isoliert. Dieses entspricht der unter Seq ID No. 3 dargestellten DNA-Sequenz und enthält einen Teil des offenen Leserahmens. Das Fragment wurde in den mit Asp718 geschnittenen binären Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221–230) ligiert. Bei diesem handelt es sich um ein Derivat des binären Vektors pBin19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711–8721). pBinAR wurde folgendermaßen konstruiert:

Ein 529 bp langes Fragment, das die Nucleotide 6909–7437 des 35S-Promotor des Cauliflowermosaik-Virus umfaßt (Franck et al., Cell 21 (1980), 285–294), wurde als EcoR I/Kpn I-Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pierzak et al., Nucl. Acids Res. 14, 5857–5868) isoliert und zwischen die EcoR I- und die Kpn I-Schnittstellen des Polylinkers von pBin19 ligiert. Dabei entstand das Plasmid pBin19-A.

Aus dem Plasmid pAGV40 (Herrera-Estrella et al., Nature 303, 209–213) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen Pvu II und Hind III ein 192 bp langes Fragment isoliert, das das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3, 835–846) umfaßt (Nucleotide 11749–11939). Nach Addition von Sph I-Linkern an die Pvu I-Schnittstelle wurde das Fragment zwischen die Sph I- und Hind III-Schnittstellen pBin19-A ligiert. Dabei entstand pBinAR.

Mit Hilfe von Restriktions- und Sequenzanalysen wurden rekombinante Vektoren identifiziert, bei denen das DNA-Fragment derart in den Vektor inseriert ist, daß ein Teil der codierenden Region der cDNA-Insertion aus pRL1 in anti-sense-Orientierung mit dem 35S-Promotor verknüpft ist. Das resultierende Plasmid, p35S-anti-RL, ist in Fig. 1 dargestellt.

Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist:

Das Fragment A (529 bp) enthält den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Das Fragment umfaßt die Nucleotide 6909 bis 7437 des CaMV (Franck et al., Cell 21 (1980), 285–294).

Das Fragment B enthält neben flankierenden Bereichen einen Teil der proteincodierenden Region der cDNA-Insertion aus dem Plasmid pRL1. Diese wurde wie oben beschrieben als Asp718-Fragment aus pRL1 isoliert und in anti-sense-Orientierung an den 35S-Promotor in pBinAR fusioniert.

Fragment C (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et

al., EMBO J. 3 (1984), 835–846).

Die Größe des Plasmids p35S-anti-RL beträgt ca. 12,8 kb. Das Plasmid wurde mit Hilfe Agrobakterien-vermittelter Transformation in Kartoffelpflanzen transferiert wie oben beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert. Die transformierten Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen kultiviert.

Die Überprüfung des Erfolges der genetischen Veränderung der Pflanzen erfolgte durch Analyse der Gesamt-RNA in einer Northern-Blot-Analyse bezüglich des Verschwindens der zu der cDNA komplementären Transkripte. Hierzu wurde Gesamt-BNA aus Blättern transformierter Pflanzen nach Standardmethoden isoliert, gelelektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz oder einen Teil dieser Sequenz aufweist. In ca. 5–10% der transformierten Pflanzen fehlte in der Northern-Blot-Analyse die Bande, die das spezifische Transkript der unter Seq ID No. 1 dargestellten Sequenz darstellt. Diese Pflanzen wurden zur Analyse der Stärkequalität verwendet.

Beispiel 7

Konstruktion des Plasmids pB33-anti-RL und Einführung des Plasmids in das Genom von Kartoffelpflanzen

Aus dem Plasmid pRL1 wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuclease Asp718 ein ca. 1800 bp langes DNA-Fragment isoliert, das einen Teil des offenen Leserahmens der cDNA-Insertion umfaßt, und in den mit Asp718 geschnittenen Vektor B33-Hyg ligiert. Dieser Vektor wurde folgendermaßen hergestellt:

Aus dem Vektor pBinAR Hyg (DSM 9505) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen EcoRI und Asp718 der 35S-Promotor entfernt. Aus dem Plasmid p33-anti-BE (DSM 6146) wurde mit Hilfe von EcoRI und Asp718 ein ca. 1526 bp langes Fragment, das den B33-Promotor umfaßt, isoliert und in den mit EcoRI und Asp718 geschnittenen Vektor pBinAR Hyg (DSM 9505) inseriert.

Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes in die Asp718-Schnittstelle des Plasmids B33-Hyg entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist (Fig. 4):

Das Fragment A enthält den B33-Promotor aus *Solanum tuberosum* (EP 3775 092; Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23–29).

Das Fragment B enthält neben flankierenden Bereichen einen Teil der proteincodierenden Region der cDNA-Insertion aus dem Plasmid pRL1. Diese wurde wie oben beschrieben als Asp718-Fragment aus pRL1 isoliert und in anti-sense-Orientierung an den B33-Promotor in B33-Hyg fusioniert.

Fragment C (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835–846).

Die Größe des Plasmids pB33-anti-RL beträgt ca. 12,8 kb. Das Plasmid wurde mit Hilfe Agrobakterien-vermittelter Transformation in Kartoffelpflanzen transferiert wie oben beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert. Die transformierten Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen kultiviert.

Die Überprüfung des Erfolges der genetischen Veränderung der Pflanzen erfolgte durch Analyse der Gesamt-BNA in einer Northern-Blot-Analyse bezüglich des Verschwindens der zu der cDNA komplementären Transkripte. Hierzu wurde Gesamt-BNA aus Knollen transformierter Pflanzen nach Standardmethoden isoliert, gelelektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz oder einen Teil dieser Sequenz aufweist. In ca. 5–10% der transformierten Pflanzen fehlte in der Northern-Blot-Analyse die Bande, die Transkripte darstellt, die mit der erfindungsgemäßen cDNA hybridisieren. Aus diesen Pflanzen wurde aus Knollen die Stärke isoliert und wie in Beispiel 8 beschrieben analysiert.

Beispiel 8

Analyse der transformierten Kartoffelpflanzen

Die gemäß Beispiel 6 und Beispiel 7 transformierten Kartoffelpflanzen wurden hinsichtlich der Eigenschaften der synthetisierten Stärke untersucht. Die Analysen wurden an verschiedenen Linien von Kartoffelpflanzen durchgeführt, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL bzw. mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren und die in der Northern-Blot-Analyse die Bande nicht mehr aufwiesen, die Transkripte darstellt, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen hybridisieren.

a) Bestimmung der Viskosität wäßriger Lösungen der Stärke

Zur Bestimmung der Viskosität der wäßrigen Lösungen der in transformierten Kartoffelpflanzen synthetisierten Stärke wurde aus Knollen von Pflanzen, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL bzw. mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren, Stärke nach Standardverfahren isoliert. Es wurden jeweils 30 g Stärke in 450 ml H₂O aufgenommen und für die Analyse in einem Viskograph E (Brabender OHG Duisburg (Deutschland)) verwendet. Der Betrieb des Gerätes erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Viskosität der wäßrigen Lösung der Stärke wurde die Stärkesuspension zunächst von 50°C auf 96°C erhitzt mit einer Geschwindigkeit von 3°C pro min. Anschließend wurde die Temperatur für 30 min bei 96°C gehalten. Danach wurde die Lösung von 96°C auf 50°C abgekühlt mit einer Geschwindigkeit von 3°C pro min. Während der gesamten Dauer wurde die Viskosität bestimmt. Repräsentative Ergebnisse derartiger Messungen sind in Form von Kurven, in denen die Viskosität in Abhängigkeit der Zeit dargestellt ist, in Fig. 3, Fig. 4 und Fig. 5 wiedergegeben. Fig. 3 zeigt eine typische Brabenderkurve für Stärke, die aus Wildtyp-Pflanzen der Kartoffelvarietät Désirée isoliert wurde. Fig. 4 und 5 zeigen eine typische Brabenderkurve für Stärke, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurde, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL bzw. pB33-anti-RL transformiert worden waren. Aus den Kurven lassen sich verschiedene charakteristische Werte ableiten.

DE 196 53 176 A 1

Für Wildtyppflanzen ergeben sich dabei folgende charakteristische Werte:

Tabelle 1

Wert	Zeit [min : sec]	Drehmoment [BE]	Temperatur [°C]
A	6 : 30	60,5 ± 17,7	69,9 ± 0,57
B	11 : 30	1838,0 ± 161,2	86,0 ± 2,1
C	15 : 15	1412,0 ± 18,4	96,0
D	45 : 15	526,0 ± 17,0	96,0
E	60 : 30	812,0 ± 8,5	50,0
F	70 : 45	853,0 ± 5,7	50,0

Die Werte geben Mittelwerte aus zwei verschiedenen Messungen wieder.

In der Tabelle 1 und den folgenden Tabellen 2 und 3 bedeuten:

A: Verkleisterungsbeginn

B: Maximale Viskosität

C: Start der Haltezeit

D: Start der Kühlzeit

E: Ende der Kühlzeit

F: Ende der End-Haltezeit.

Für Pflanzen, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL transformiert worden waren (Linie P2), ergeben sich dabei folgende charakteristische Werte:

Tabelle 2

Wert	Zeit [min : sec]	Drehmoment [BE]	Temperatur [°C]
A	6 : 00	50,0	69,0
B	14 : 00	820,0	93,0
C	15 : 15	815,0	96,0
D	45 : 15	680,0	96,0
E	60 : 30	1150,0	50,0
F	70 : 45	1200,0	50,0

Für Pflanzen, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren (Linie P3), ergeben sich dabei folgende Werte:

Tabelle 3

Wert	Zeit [min : sec]	Drehmoment [BE]	Temperatur [°C]
A	7:0	31,0	71,0
B	12:45	671,0	88,3
C	15:15	662,0	96,0
D	45:15	607,0	96,0
E	60:30	1063,0	50,0
F	70:45	1021,0	50,0

Aus den Fig. 3, 4 und 5 geht deutlich hervor, daß die Stärke aus transformierten Pflanzen sich von der aus Wildtyp-

Pflanzen insbesondere dadurch unterscheidet, daß beim Aufkochen nur eine sehr geringe Viskositätszunahme erfolgt. So liegt die maximale Viskosität bei der modifizierten Stärke aus transformierten Pflanzen beim Aufkochen um mehr als 50% unter dem Wert der Wildtyp-Stärke.

Andererseits steigt die Viskosität der aus transformierten Pflanzen isolierten Stärke nach dem Abkühlen stärker an als bei Wildtyp-Stärke.

b) Bestimmung des Phosphatgehaltes der Stärke

Der Phosphatgehalt der Stärke wurde bestimmt, indem die Menge an Phosphat, das an der C-6-Position von Glucose-resten gebunden war, gemessen wurde. Hierzu wurde Stärke zunächst durch Säurehydrolyse gespalten und anschließend der Gehalt an Glucose-6-Phosphat mittels eines Enzymtests bestimmt, wie im folgenden beschrieben.

100 mg Stärke wurden in 500 µl 0,7 N HCl 4 h bei 100°C inkubiert. Nach der Säurehydrolyse wurden 10 µl des Ansatzes in 600 µl Imidazolpuffer (100 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂, pH 6,9, 0,4 mM NAD⁺) gegeben. Die Bestimmung der Menge an Glucose-6-Phosphat in dem Ansatz erfolgte durch Umsetzung mit dem Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Dazu wurde dem Ansatz 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (aus *Leuconostoc mesenteroides* (Boehringer Mannheim)) zugesetzt und die Menge an gebildetem NADH durch Messung der Absorption bei 340 nm bestimmt.

Der Gehalt an Glucose-6-Phosphat/Milligramm Stärke ist in der folgenden Tabelle für nicht-transformierte Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée sowie für zwei Linien (P1(35S-anti-RL; P2(35S-anti-RL)) transgener Kartoffelpflanzen, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL transformiert worden waren, angegeben.

Tabelle 4

Pflanzen	nmol Glucose-6-Phosphat/mg Stärke	%
Wildtyp	12,89 ± 1,34	100
P1 (35S-anti-RL)	2,25 ± 0,41	17,4
P2 (35S-anti-RL)	1,25 ± 0	9,7

Die folgende Tabelle zeigt den Glucose-6-Phosphat-Gehalt pro Milligramm Stärke bei Kartoffelpflanzen, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren, im Vergleich zu Stärke aus nicht-transformierten Pflanzen (*S. tuberosum* c.v. Désirée).

Tabelle 5

Pflanzen	nmol Glucose-6-Phosphat/mg Stärke	%
Wildtyp	9,80 ± 0,68	100
7	4,50 ± 0,73	45,9
37	2,64 ± 0,99	26,9
45	1,14 ± 0,44	11,6
31	1,25 ± 0,49	12,8

Die Pflanzen 7, 37, 45 und 31 stellen unabhängige Transformanten dar, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren. Die Pflanze 37 repräsentiert die Linie P3, für die in Fig. 5 eine Brabenderkurve dargestellt ist.

Die Werte zeigen, daß der Phosphatgehalt der modifizierten Stärke aus transgenen Kartoffelpflanzen um mindestens ca. 50% im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen verringert ist.

c) Bestimmung des Glucose-, Fructose- und Saccharosegehalts von Knollen nach Lagerung bei 4°C

Knollen von Pflanzen verschiedener transgener Linien, die mit dem antisense-Konstrukt p35S-anti-RL transformiert worden waren, und von Wildtyp-Pflanzen wurden für 2 Monate bei 4°C bzw. bei 20°C im Dunkeln gelagert. Anschließend wurden wie oben beschrieben die Mengen an Glucose, Fructose und Saccharose bestimmt. Dabei ergaben sich für zwei transgene Linien folgende repräsentative Werte:

Tabelle 6

	Glucose		Fructose		Saccharose	
	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C
Wildtyp cv Désirée	0,84	55,4	0,62	52,8	8,5	13,1
Transgene Linie 15	1,12	6,7	0,75	7,8	7,5	10,1
Transgene Linie 11	1,00	6,4	0,75	7,5	6,9	6,9

Die Werte in der Tabelle sind in μmol Hexose bzw. Saccharose/g Frischgewicht angegeben.

Aus den Werten in Tabelle 6 wird deutlich, daß bei den transgenen Pflanzen bei einer Lagerung bei 4°C eine wesentlich geringere Akkumulation reduzierender Zucker in den Knollen stattfindet als bei Wildtyp-Pflanzen.

Insgesamt ähnelt die aus transgenen Kartoffelpflanzen isolierte modifizierte Stärke der Stärke aus Mais-Wildtyp-Pflanzen. Im Vergleich zu dieser besitzt sie den Vorteil, daß sie geschmacksneutral ist und so für verschiedene Verwendungsmöglichkeiten im Nahrungsmittelbereich besser geeignet ist.

Beispiel 9

Expression der cDNA-Insertion des Plasmids pRL2 in E. coli

(a) Transformation von Bakterienzellen

Zur Expression der cDNA-Insertion des Plasmids pRL2 wurden Zellen des E. coli-Stammes DH5 α zunächst mit dem Plasmid pACAC transformiert. Dieses Plasmid enthält ein DNA-Fragment, das die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) aus E. coli codiert, unter der Kontrolle des lac Z-Promotors. Das Fragment war als ca. 1,7 kb großes DraI/HaeII-Fragment aus dem Vektor pEcA-15 (siehe B. Müller-Röber (1992), Dissertation, FU Berlin) isoliert worden und nach Glättung der Enden in einen mit HindIII linearisierten pACAC184-Vektor cloniert worden. Die Expression der AGPase soll eine Steigerung der Glycogensynthese in transformierten E. coli Zellen bewirken. Die derart transformierten Zellen werden im folgenden als E. coli-K1-Zellen bezeichnet.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität des durch die cDNA des Plasmids pRL2 codierten Proteins, wurden E. coli-K1-Zellen mit dem Plasmid pRL2 transformiert. Die transformierten E. coli-Zellen, die sowohl das Plasmid pACAC als auch das Plasmid pRL2 enthalten, werden im folgenden als E. coli-K2-Zellen bezeichnet.

Der Transfer der Plasmid-DNA in die Bakterienzellen erfolgte jeweils nach der Methode von Hanahan (J. Mol. Biol. 166 (1983), 557-580). Die transformierten E. coli Zellen wurden auf Agarkulturschalen mit folgender Zusammensetzung ausgestrichen:

YT-Medium mit
1,5% Bacto-Agar
50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2
1% Glucose

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol bei E. coli-K1-Zellen bzw.
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol und
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin bei E. coli-K2-Zellen.

Escherichia coli Zellen des Stammes DH5 α , die mit dem Plasmid pRL2 + pACAC (E. coli-K2-Zellen) sowie als Kontrolle nur mit dem Plasmid pACAC (E. coli-K1-Zellen) transformiert worden sind, wurden auf Agarplatten angezogen. Das gebildete Glycogen der verschiedenen Kulturen wurde bezüglich des Phosphorylierungsgrades (an C-6-Position des Glucosemoleküls) hin untersucht, wie im folgenden beschrieben wird.

(b) Isolierung von bakteriellem Glycogen

Zur Isolierung von bakteriellem Glycogen wurde der nach der Transformation gewachsene Bakterienrasen von jeweils 6 Agarplatten (\varnothing 135 mm) mit 5 ml YT-Medium/Platte abgeschwemmt. Die Bakteriensuspension wurde bei 4500 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Bakterienniederschlag wurde in 10 ml YT-Medium resuspendiert. Der Aufschluß der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 2 Volumen Aufschlußmedium (0,2 N NaOH; 1% SDS) und Inkubation für 5 Minuten

bei RT. Durch Zugabe von 3 Volumen EtOH abs., 30 minütiger Inkubation bei 4°C und anschließender Zentrifugation von 15 Minuten bei 8000 g_x wurde das Glycogen sedimentiert. Anschließend wurde der Niederschlag mit 100 ml 70%igem EtOH gewaschen und erneut durch einen Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei 8000 g_x) sedimentiert. Der Waschvorgang wurde 4 mal wiederholt.

(c) Bestimmung des Gesamtglycogengehaltes

Das isolierte und sedimentierte Glycogen wurde zunächst durch saure Hydrolyse (Lösen des Niederschlags in 2 ml 0,7 N HCl; Inkubation für 4 Stunden bei 100°C) in die einzelnen Glucosemoleküle aufgespalten. Der Glucosegehalt der Lösung wurde mittels gekoppelter enzymatischer Reaktion eines Stärke-Tests nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) an einem Photometer (Firma Kontron) bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt.

Der Reaktionspuffer enthält:

100 mM MOPS, pH 7,5

10 mM MgCl₂

2 mM EDTA

0,25 mM NADP

1 mM ATP

1 U/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

2 U/ml Hexokinase.

Die Messung erfolgte bei 25°C mit 10 µl Glucoselösung.

(d) Bestimmung des Glucose-6-Phosphat Gehaltes

Zur Bestimmung des Gehaltes der an C-6-Position phosphorylierten Glucosemoleküle wurden gleiche Stoffmengen an Glucose, jeweils der verschiedenen Bakterienkulturen, eingesetzt. Durch Zugabe von gleichen Volumina an 0,7 N KOH zu dem mittels saurer Hydrolyse (siehe oben) in seine Glucosemoleküle aufgespaltenen Glycogens, wurde die Lösung neutralisiert.

Der Reaktionspuffer enthält:

100 mM MOPS, pH 7,5

10 mM MgCl₂

2 mM EDTA

0,25 mM NADP

2 U/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Die Messung erfolgte bei 25°C mit 100–150 µl Glucoselösung.

(e) Nachweis einer bakterielles Glycogen phosphorylierenden Enzymaktivität

Die Ergebnisse der Bestimmung des Phosphatgehaltes des in den Bakterienzellen synthetisierten Glycogens zeigen, daß das Glycogen der E. coli Zellen, die mit den Plasmiden pACAC + pRL2 transformiert worden waren, eine bis zu 290 ± 25% erhöhte Phosphorylierung an C-6-Position der Glucose aufweist, verglichen mit dem Kontrollansatz (E. coli Zellen transformiert mit dem Plasmid pACYC) (siehe folgende Tabelle).

E. coli-Zellen: Glucose-6-Phosphat : Glucose im Glycogen

E. coli-K1: 1:(4600 ± 1150)

E. coli-K2: 1:(1570 ± 390).

Die hier dargestellten Phosphorylierungsgrade sind der Mittelwert aus mindestens 6 Messungen ausgehend von 6 unabhängigen Transformationen und Glycogenisolierungen.

Beispiel 10

Einführung des Plasmids p35S-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid p35SH-anti-BE in das Genom von Kartoffelpflanzen

Das Plasmid p35S-anti-RL wurde konstruiert wie im Beispiel 6 beschrieben. Das Plasmid p35SH-anti-BE wurde konstruiert wie in der Anmeldung WO95/07355, Beispiel 3, beschrieben. Beide Plasmide wurden mit Hilfe der Agrobacterium vermittelter Transformation wie oben beschrieben sequentiell in Kartoffelpflanzen transferiert. Dazu wurde zunächst das Plasmid p35SH-anti-BE in Kartoffelpflanzen transformiert. Es wurden ganze Pflanzen regeneriert und auf eine verringerte Expression des branching-Enzyms selektiert. Anschließend wurde das Plasmid p35S-anti-RL in die schon reduzierte Expression des branching-Enzyms aufweisenden transgenen Pflanzen transformiert. Aus den transformierten Zellen wurden wiederum transgene Pflanzen regeneriert, und die transformierten Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Die Überprüfung des Erfolges der genetischen Veränderung der Pflanzen in Bezug auf eine stark reduzierte Expression sowohl des branching-Enzyms als auch in Bezug auf eine stark reduzierte Expression des RL-Gens erfolgte durch Analyse der gesamten BNA in einer BNA-Blot-Analyse bezüglich des Verschwindens der zu Verzweigungsenzym-cDNA bzw. RL-cDNA komplementären Transkripte. Hierzu wurde die Gesamt-BNA aus Blätter transformierten Pflanzen nach beschriebenen Methoden isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz oder einen Teil dieser Sequenz aufweist und anschließend mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die Sequenz der Verzweigungsenzym-cDNA (vgl. WO92/14827, Beispiel 1) oder einen Teil derselben aufweist. In ca. 5%–10% der transformierten Pflanzen fehlte in der BNA-Blot-Analyse sowohl die Bande, die das spezifische Transkript

der unter Seq. ID No. 1 dargestellten Sequenz darstellt als auch die Bande, die das spezifische Transkript der Verzweigungsenzym-cDNA (vgl. WO92/14827, Beispiel 1) darstellt. Diese Pflanzen, welche als R4-Pflanzen bezeichnet wurden, wurden zur Analyse der Qualität der in den Knollen enthaltenen Stärke eingesetzt.

5

Beispiel 11

Einführung des Plasmids pB33-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI in das Genom von Kartoffelpflanzen

10 Das Plasmid pB33-anti-RL wurde konstruiert wie im Beispiel 7 beschrieben. Das Plasmid pB33-anti-GBSSI wurde wie folgt konstruiert:

Das DraI/DraI Fragment aus der Promotorregion des Patatin Klasse I Gens B33 von *Solanum tuberosum*, umfassend die Nucleotide -1512 bis +14 (Rocha-Sosa et al., EMBO J 8 (1989), 23-29) wurde in die SmaI Schnittstelle des Plasmids pUC19 ligiert. Aus dem entstandenen Plasmid wurde das Promotorfragment als EcoRI/HindIII Fragment in die polylinker Region des Plasmids pBin19 (Bevan, Nucleic Acids Research 12 (1984), 8711-8721) ligiert. Anschließend wurde 15 das 3' EcoRI Fragment 1181 bis 2511 des GBSSI-Gens von *Solanum tuberosum* (Hergersberg, Dissertation (1988) Universität zu Köln) in die EcoRI Schnittstelle des entstandenen Plasmids ligiert.

Beide Plasmide wurden mit Hilfe Agrobacterium vermittelter Transformation sequentiell in Kartoffelpflanzen transferiert wie unter Beispiel 10 beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert, und die transformierten Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Die Überprüfung des Erfolges der genetischen Veränderungen der Pflanzen erfolgte durch Analyse der Gesamt-BNA in einer BNA-Blot-Analyse bezüglich des Verschwindens der zu den beiden cDNAs komplementären Transkripte. Hierzu wurde die Gesamt-BNA aus Knollen transformierter Pflanzen nach Standardmethoden isoliert, gelelektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte 25 Sequenz oder einen Teil der Sequenz aufweist. Danach wurde die gleiche Membran mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die Sequenz des GBSSI-Gens oder einen Teil dieser Sequenz aufweist (Hergersberg, Dissertation (1988) Universität zu Köln). In ca. 5% bis 10% der transformierten Pflanzen fehlte in der BNA-Blot-Analyse die Bande, die Transkripte darstellt, die mit der erfindungsgemäßen cDNA bzw. mit der GBSSI-cDNA hybridisierten. Aus den Knollen dieser Pflanzen, welche als R3-Pflanzen bezeichnet wurden, wurde Stärke isoliert und analysiert.

30

Beispiel 12

Stärkeanalyse der R4-Pflanzen

35 Die gemäß Beispiel 10 transformierten Kartoffelpflanzen wurden hinsichtlich der Eigenschaften der synthetisierten Stärke untersucht. Die Analysen wurden an verschiedenen Linien von Kartoffelpflanzen durchgeführt, die mit den beiden Plasmiden p35S-anti-RL und p35SH-anti-BE transformiert worden waren und die in der BNA-Blot-Analyse die Banden nicht mehr oder stark reduziert aufwiesen, die Transkripte darstellen, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. mit der Sequenz der Verzweigungs-cDNA hybridisieren.

40

a) Bestimmung der Viskosität wäßriger Lösungen der Stärke

Zur Bestimmung der Viskosität der wäßrigen Lösungen der in transformierten Kartoffelpflanzen synthetisierten Stärke wurde aus Knollen von Pflanzen, die mit dem Plasmid p35S-anti-RL und mit dem Plasmid p35SH-anti-BE transformiert 45 worden waren, Stärke nach Standardverfahren isoliert. Es wurden jeweils 2 g Stärke in 25 ml H₂O aufgenommen und für die Analyse in einem Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) verwendet. Der Betrieb des Gerätes erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Viskosität der wäßrigen Lösung der Stärke wurde die Stärkesuspension zunächst von 50°C auf 95°C erhitzt mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro min. Anschließend wurde die Temperatur für 2,5 min bei 95°C gehalten. Danach wurde die Lösung von 95°C auf 50°C abgekühlt mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro min. Während der gesamten Dauer wurde 50 die Viskosität bestimmt. Repräsentative Ergebnisse derartiger Messungen sind in Form von Kurven, in denen die Viskosität in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt ist, wiedergegeben. Fig. 6 zeigt unter 1 eine typische RVA-Kurve für Stärke, die aus Wildtyp-Pflanzen der Kartoffelvarietät Désirée isoliert wurde. Linie 2 bzw. 3 zeigen typische RVA-Kurven für Stärken, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurde, die mit dem Plasmid p35SH-anti-BE bzw. p35S-anti-RL transformiert worden waren. Linie 4 zeigt eine typische RVA-Kurve für Stärke, die aus den Knollen von Pflanzen isoliert 55 worden ist, die mit dem Plasmid p35SH-anti-BE in Kombination mit dem Plasmid p35S-anti-RL transformiert worden ist. Linie 4 zeichnet sich durch das Fehlen jedweder Viskositätszunahme in Abhängigkeit von der Temperatur aus.

60

b) Bestimmung des Amylose/Amylopektinverhältnisses

Aus den Knollen von transformierten Kartoffelpflanzen isolierte Stärke wurde auf das Amylose zu Amylopektinverhältnis untersucht. Dabei ergab sich für die Pflanzenlinie R4-1 (dargestellt in Linie 4 der Fig. 6) ein Amylosegehalt von über 70%. Für die Pflanzenlinie R4-3 ergab sich ein Amylosewert von 27%, während der Amylosegehalt in Wildtypstärke aus der Sorte Désirée zwischen 19 und 22% liegt.

65

Stärkeanalyse der R3-Pflanzen

Die gemäß Beispiel 11 transformierten Kartoffelpflanzen wurden hinsichtlich der Eigenschaften der synthetisierten Stärke untersucht. Die Analysen wurden an verschiedenen Linien von Kartoffelpflanzen durchgeführt, die mit den beiden Plasmiden pB33-anti-RL und pB33-anti-GBSSI transformiert worden waren und die in der BNA-Blot-Analyse die Banden nicht mehr oder stark reduziert aufwiesen, die Transkripte darstellen, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. mit der Sequenz der GBSSI-cDNA hybridisieren.

a) Bestimmung der Viskosität wäßriger Lösungen der Stärke

Zur Bestimmung der Viskosität der wäßrigen Lösungen der in transformierten Kartoffelpflanzen synthetisierten Stärke wurde aus Knollen von Pflanzen, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI transformiert worden waren, Stärke nach Standardverfahren isoliert. Die Bestimmung der Viskosität mittels eines Rapid Visco Analysers erfolgte nach der in Beispiel 12, Teil a, beschriebenen Methode. Die Ergebnisse sind in Fig. 7 dargestellt. Fig. 7 zeigt in Linie 1 eine typische RVA-Kurve für Stärke, die aus Wildtyp-Pflanzen der Kartoffelvarietät Désirée isoliert wurde. Linie 2 bzw. 3 zeigen typische RVA-Kurven für Stärken, die aus Kartoffelpflanzen isoliert wurde, die mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI bzw. p35S-anti-RL transformiert worden waren. Linie 4 zeigt eine typische RVA-Kurve für Stärke, die aus den Kartoffelpflanzen isoliert wurde, die mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI in Kombination mit dem Plasmid pB33-anti-RL transformiert worden waren. Diese Kurve zeichnet sich durch das Fehlen des Viskositätsmaximums sowie dem Fehlen des Anstiegs der Viskosität bei 50°C aus. Des weiteren zeichnet sich diese Stärke dadurch aus, daß der nach RVA-Behandlung erhaltene Kleister so gut wie keine Retrogradation nach mehrtägiger Inkubation bei Raumtemperatur aufweist.

b) Bestimmung des Amylose/Amylopektinverhältnisses

Aus den Knollen von transformierten Kartoffelpflanzen isolierte Stärke wurde auf das Amylose zu Amylopektinverhältnis untersucht. Dabei ergab sich für die Pflanzenlinie R3-5 (dargestellt in Linie 4 der Fig. 7) ein Amylosegehalt von unter 4%, für die Pflanzenlinie R3-6 ein Amylosegehalt von unter 3%. Der Amylosegehalt in Wildtypstärke aus der Sorte Désirée liegt zwischen 19 und 22%.

c) Bestimmung des Phosphatgehaltes der Stärke

Der Phosphatgehalt der Stärke wurde bestimmt, indem die Menge an Phosphat, das an der C-6-Position von Glucose-resten gebunden war, gemessen wurde. Hierzu wurde Stärke zunächst durch Säurehydrolyse gespalten und anschließend der Gehalt an Glucose-6-Phosphat mittels eines Enzymtests bestimmt, wie im folgenden beschrieben.

100 mg Stärke wurden in 500 µl 0,7 N HCl 4 h bei 100°C inkubiert. Nach der Säurehydrolyse wurden 10 µl des Ansatzes in 600 µl Imidazolpuffer (100 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂, pH 6,9, 0,4 mM NAD⁺) gegeben. Die Bestimmung der Menge an Glucose-6-Phosphat in dem Ansatz erfolgte durch Umsetzung mit dem Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Dazu wurde dem Ansatz 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (aus *Leuconostoc mesenteroides* (Boehringer Mannheim)) zugesetzt und die Menge an gebildetem NADH durch Messung der Absorption bei 340 nm bestimmt.

Der Gehalt an Glucose-6-Phosphat/Milligramm Stärke ist in der folgenden Tabelle für nicht-transformierte Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée sowie für die Linien R3-5 und R3-6 transgener Kartoffelpflanzen, die mit dem Plasmid pB33-anti-RL in Kombination mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI transformiert worden waren, angegeben. Zum Vergleich ist der Wert für die Stärke aus der sog. waxy-Kartoffel (US2-10) mit angegeben, die mit dem Plasmid pB33-anti-GBSSI transformiert worden war.

Tabelle 7

Pflanzen	nmol Glucose-6-Phosphat/mg Stärke	%
Wildtyp	9,80 ± 0,68	100
R3-5	1,32 ± 0,10	13
R3-6	1,37 ± 0,15	14
US2-10	10,82 ± 0,42	110

Beispiel 14

Isolierung einer cDNA-Sequenz, die ein R1-Enzym aus *Zea mays* codiert

Bakterien des Stammes XL1-Blue wurden mit Lambdaphagen infiziert, deren Phagenköpfe eine cDNA-Bibliothek aus Endosperm-Gewebe von *Zea mays* enthielten (Stratagene, Heidelberg). Die infizierten *E. coli*-Zellen wurden auf Medium in Petrischalen mit einer Dichte von ca. 25000 Plaques pro ca. 75 cm² plattiert. Nach etwa 9-stündiger Inkubation

wurden Nitrozellulosefilter auf den lysierten Bakterienrasen aufgelegt, die nach 1 Minute abgenommen wurden. Die Filter wurden für 2 Minuten in 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl, dann für 2 Minuten in 0.5 M Tris HCl pH 7.0 inkubiert und anschließend für 2 Minuten in 2× SSC gewaschen. Nach Trocknung und Fixierung durch UV-Crosslinking wurden die Filter 3 Stunden in Puffer A inkubiert, bevor die radioaktiv markierte DNA-Probe (random priming) zugesetzt wurde. Als Probe wurde ein ca. 2.7 großer Bereich der DNA-Insertion des Plasmids pRL2 (siehe Beispiel 4 und 5) verwendet. Dieses Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und HindII herausgeschnitten und repräsentiert die 3'-gelegene Hälfte der cDNA-Insertion in pRL2 (siehe Fig. 8).

Nach 12stündiger Hybridisierung bei 48°C wurden die Filter 1× 10 Minuten in 2× SSC/1% SDS bei Raumtemperatur und anschließend 2× 20 Minuten in 1× SSC/0.5% SDS bei 35°C gewaschen und autoradiographiert.

In drei Sondierungszyklen wurden Phagenclone, die eine cDNA-Insertion enthalten, vereinzelt. Auf diese Weise wurden bei der Durchmusterung von ca. 1.500.000 Phagenplaques ca. 6 Plaques identifiziert.

Diese positiven Phagenclone wurden für die in-vivo excision eines pBluescript-Plasmids nach Standardverfahren eingesetzt. Die DNA-Sequenzen der entsprechenden Insertionen wurden nach dem Verfahren von Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463–5467) bestimmt. So konnten mehrere Clone identifiziert werden, die Insertionen enthalten, die ein R1-Enzym aus Mais codieren. Die cDNA-Insertion eines geeigneten Clons, R1M, wurde vollständig bestimmt. Die Nucleinsäuresequenz ist dargestellt in Seq ID No. 5. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist dargestellt in Seq ID No. 6.

Eine geeignete cDNA-Insertion des Clons R1M wurde nach Standardverfahren (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbour Laboratory Press, (1989), NY, USA) aus dem pBluescript-Derivat mit NotI und XhoI isoliert, die Schnittstellen geglättet und in den Vektor pUBIbar in die HpaI-Schnittstelle inseriert. Dieses Plasmid kann zur Transformation pflanzlicher Zellen, insbesondere Mais, nach den oben angegebenen Methoden verwendet werden.

DE 196 53 176 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Emmermann, Michael
(B) STRASSE: Afrikanische Straße 144c
(C) ORT: Berlin
(E) LAND: DE
(F) POSTLEITZAHL: 13351

5

10

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Koßmann, Jens
(B) STRASSE: Golmer Fichten 9
(C) ORT: Golm
(E) LAND: DE
(F) POSTLEITZAHL: 14476

15

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neue Nucleinsäuremoleküle aus Mais und ihre Verwendung zur Herstellung einer modifizierten Stärke

20

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

25

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 4856 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

35

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
(B) STAMM: C.V. Berolina

45

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 105..4497

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CATCTTCATC GAATTTCTCG AAGCTTCTTC GCTAATTTCC TGGTTTCTTC ACTCAAAATC

60

55

GACGTTTCTA GCTGAACTTG AGTGAATTAA GCCAGTGGGA GGAT ATG AGT AAT TCC
Met Ser Asn Ser

116

1

60

65

DE 196 53 176 A 1

	TTA GGG AAT AAC TTG CTG TAC CAG GGA TTC CTA ACC TCA ACA GTG TTG	164
	Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr Ser Thr Val Leu	
	5 10 15 20	
5	GAA CAT AAA AGT AGA ATC AGT CCT CCT TGT GTT GGA GGC AAT TCT TTG	212
	Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly Gly Asn Ser Leu	
	25 30 35	
10	TTT CAA CAA CAA GTG ATC TCG AAA TCA CCT TTA TCA ACT GAG TTT CGA	260
	Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser Thr Glu Phe Arg	
	40 45 50	
15	GGT AAC AGG TTA AAG GTG CAG AAA AAG AAA ATA CCT ATG GAA AAG AAG	308
	Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro Met Glu Lys Lys	
	55 60 65	
20	CGT GCT TTT TCT AGT TCT CCT CAT GCT GTA CTT ACC ACT GAT ACC TCT	356
	Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr Thr Asp Thr Ser	
	70 75 80	
25	TCT GAG CTA GCA GAA AAG TTC AGT CTA GGG GGG AAT ATT GAG CTA CAG	404
	Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn Ile Glu Leu Gln	
	85 90 95 100	
30	GTT GAT GTT AGG CCT CCC ACT TCA GGT GAT GTG TCC TTT GTG GAT TTT	452
	Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser Phe Val Asp Phe	
	105 110 115	
35	CAA GTA ACA AAT GGT AGT GAT AAA CTG TTT TTG CAC TGG GGG GCA GTA	500
	Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Val	
	120 125 130	
40	AAA TTC GGG AAA GAA ACA TGG TCT CTT CCG AAT GAT CGT CCA GAT GGG	548
	Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp Arg Pro Asp Gly	
	135 140 145	
45	ACC AAA GTG TAC AAG AAC AAA GCA CTT AGA ACT CCA TTT GTT AAA TCT	596
	Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser	
	150 155 160	
50	GGC TCT AAC TCC ATC CTG AGA CTG GAG ATA CGA GAC ACT GCT ATC GAA	644
	Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp Thr Ala Ile Glu	
	165 170 175 180	
55	GCT ATT GAG TTT CTC ATA TAC GAT GAA GCC CAC GAT AAA TGG ATA AAG	692
	Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp Lys Trp Ile Lys	
	185 190 195	
60	AAT AAT GGT GGT AAT TTT CGT GTC AAA TTG TCA AGA AAA GAG ATA CGA	740
	Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg Lys Glu Ile Arg	
	200 205 210	
65	GGC CCA GAT GTT TCT GTT CCT GAG GAG CTT GTA CAG ATC CAA TCA TAT	788
	Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr	
	215 220 225	

DE 196 53 176 A 1

TTG AGG TGG GAG AGG AAG GGA AAA CAG AAT TAC CCC CCT GAG AAA GAG Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Glu 230 235 240	836	
AAG GAG GAA TAT GAG GCT GCT CGA ACT GTG CTA CAG GAG GAA ATA GCT Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln Glu Glu Ile Ala 245 250 255 260	884	5
CGT GGT GCT TCC ATA CAG GAC ATT CGA GCA AGG CTA ACA AAA ACT AAT Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu Thr Lys Thr Asn 265 270 275	932	10
GAT AAA AGT CAA AGC AAA GAA GAG CCT CTT CAT GTA ACA AAG AGT GAT Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val Thr Lys Ser Asp 280 285 290	980	15
ATA CCT GAT GAC CTT GCC CAA GCA CAA GCT TAC ATT AGG TGG GAG AAA Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys 295 300 305	1028	20
GCA GGA AAG CCG AAC TAT CCT CCA GAA AAG CAA ATT GAA GAA CTC GAA Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile Glu Glu Leu Glu 310 315 320	1076	25
GAA GCA AGA AGA GAA TTG CAA CTT GAG CTT GAG AAA GGC ATT ACC CTT Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Lys Gly Ile Thr Leu 325 330 335 340	1124	30
GAT GAG TTG CGG AAA ACG ATT ACA AAA GGG GAG ATA AAA ACT AAG GTG Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile Lys Thr Lys Val 345 350 355	1172	35
GAA AAG CAC CTG AAA AGA AGT TCT TTT GCC GTT GAA AGA ATC CAA AGA Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu Arg Ile Gln Arg 360 365 370	1220	40
AAG AAG AGA GAC TTT GGG CAT CTT ATT AAT AAG TAT ACT TCC AGT CCT Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr Thr Ser Ser Pro 375 380 385	1268	45
GCA GTA CAA GTA CAA AAG GTC TTG GAA GAA CCA CCA GCC TTA TCT AAA Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ala Leu Ser Lys 390 395 400	1316	50
ATT AAG CTG TAT GCC AAG GAG AAG GAG GAG CAG ATT GAT GAT CCG ATC Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile Asp Asp Pro Ile 405 410 415 420	1364	55
CTA AAT AAA AAG ATC TTT AAG GTC GAT GAT GGG GAG CTA CTG GTA CTG Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu Leu Leu Val Leu 425 430 435	1412	60
GTA GCA AAG TCC TCT GGG AAG ACA AAA GTA CAT CTA GCT ACA GAT CTG Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asp Leu 440 445 450	1460	65

DE 196 53 176 A 1

	AAT CAG CCA ATT ACT CTT CAC TGG GCA TTA TCC AAA AGT CCT GGA GAG	1508
	Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ser Pro Gly Glu	
	455 460 465	
5	TGG ATG GTA CCA CCT TCA AGC ATA TTG CCT CCT GGG TCA ATT ATT TTA	1556
	Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly Ser Ile Ile Leu	
	470 475 480	
10	GAC AAG GCT GCC GAA ACA CCT TTT TCA GCC AGT TCT TCT GAT GGT CTA	1604
	Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asp Gly Leu	
	485 490 495 500	
15	ACT TCT AAG GTA CAA TCT TTG GAT ATA GTA ATT GAA GAT GGC AAT TTT	1652
	Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu Asp Gly Asn Phe	
	505 510 515	
20	GTG GGG ATG CCA TTT GTT CTT TTG TCT GGT GAA AAA TGG ATT AAG AAC	1700
	Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys Trp Ile Lys Asn	
	520 525 530	
25	CAA GGG TCG GAT TTC TAT GTT GGC TTC AGT GCT GCA TCC AAA TTA GCA	1748
	Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala Ser Lys Leu Ala	
	535 540 545	
30	CTC AAG GCT GCT GGG GAT GGC AGT GGA ACT GCA AAG TCT TTA CTG GAT	1796
	Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys Ser Leu Leu Asp	
	550 555 560	
35	AAA ATA GCA GAT ATG GAA AGT GAG GCT CAG AAG TCA TTT ATG CAC CGG	1844
	Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg	
	565 570 575 580	
40	TTT AAT ATT GCA GCT GAC TTG ATA GAA GAT GCC ACT AGT GCT GGT GAA	1892
	Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu	
	585 590 595	
45	CTT GGT TTT GCT GGA ATT CTT GTA TGG ATG AGG TTC ATG GCT ACA AGG	1940
	Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg	
	600 605 610	
50	CAA CTG ATA TGG AAC AAA AAC TAT AAC GTA AAA CCA CGT GAA ATA AGC	1988
	Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser	
	615 620 625	
55	AAG GCT CAG GAC AGA CTT ACA GAC TTG TTG CAG AAT GCT TTC ACC AGT	2036
	Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Ala Phe Thr Ser	
	630 635 640	
60	CAC CCT CAG TAC CGT GAA ATT TTG CGG ATG ATT ATG TCA ACT GTT GGA	2084
	His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Thr Val Gly	
	645 650 655 660	
65	CGT GGA GGT GAA GGG GAT GTA GGA CAG CGA ATT AGG GAT GAA ATT TTG	2132
	Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu	
	665 670 675	

DE 196 53 176 A 1

GTC ATC CAG AGG AAC AAT GAC TGC AAG GGT GGT ATG ATG CAA GAA TGG Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Gln Glu Trp 680 685 690	2180	
CAT CAG AAA TTG CAT AAT AAT ACT AGT CCT GAT GAT GTT GTG ATC TGT His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys 695 700 705	2228	5
CAG GCA TTA ATT GAC TAC ATC AAG AGT GAT TTT GAT CTT GGT GTT TAT Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu Gly Val Tyr 710 715 720	2276	10
TGG AAA ACC CTG AAT GAG AAC GGA ATA ACA AAA GAG CGT CTT TTG AGT Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser 725 730 735 740	2324	15
TAT GAC CGT GCT ATC CAT TCT GAA CCA AAT TTT AGA GGA GAT CAA AAG Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly Asp Gln Lys 745 750 755	2372	20
GGT GGT CTT TTG CGT GAT TTA GGT CAC TAT ATG AGA ACA TTG AAG GCA Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala 760 765 770	2420	25
GTT CAT TCA GGT GCA GAT CTT GAG TCT GCT ATT GCA AAC TGC ATG GGC Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Asn Cys Met Gly 775 780 785	2468	30
TAC AAA ACT GAG GGA GAA GGC TTT ATG GTT GGA GTC CAG ATA AAT CCT Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro 790 795 800	2516	35
GTA TCA GGC TTG CCA TCT GGC TTT CAG GAC CTC CTC CAT TTT GTC TTA Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu His Phe Val Leu 805 810 815 820	2564	40
GAC CAT GTG GAA GAT AAA AAT GTG GAA ACT CTT CTT GAG AGA TTG CTA Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu Glu Arg Leu Leu 825 830 835	2612	45
GAG GCT CGT GAG GAG CTT AGG CCC TTG CTT CTC AAA CCA AAC AAC CGT Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Pro Asn Asn Arg 840 845 850	2660	50
CTA AAG GAT CTG CTG TTT TTG GAC ATA GCA CTT GAT TCT ACA GTT AGA Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg 855 860 865	2708	55
ACA GCA GTA GAA AGG GGA TAT GAA GAA TTG AAC AAC GCT AAT CCT GAG Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Asn Pro Glu 870 875 880	2756	60
AAA ATC ATG TAC TTC ATC TCC CTC GTT CTT GAA AAT CTC GCA CTC TCT Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser 885 890 895 900	2804	65

DE 196 53 176 A 1

	GTG GAC GAT AAT GAA GAT CTT GTT TAT TGC TTG AAG GGA TGG AAT CAA	2852
	Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln	
	905 910 915	
5	GCT CTT TCA ATG TCC AAT GGT GGG GAC AAC CAT TGG GCT TTA TTT GCA	2900
	Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp Ala Leu Phe Ala	
	920 925 930	
10	AAA GCT GTG CTT GAC AGA ACC CGT CTT GCA CTT GCA AGC AAG GCA GAG	2948
	Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Ala Glu	
	935 940 945	
15	TGG TAC CAT CAC TTA TTG CAG CCA TCT GCC GAA TAT CTA GGA TCA ATA	2996
	Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Ile	
	950 955 960	
20	CTT GGG GTG GAC CAA TGG GCT TTG AAC ATA TTT ACT GAA GAA ATT ATA	3044
	Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile	
	965 970 975 980	
25	CGT GCT GGA TCA GCA GCT TCA TTA TCC TCT CTT CTT AAT AGA CTC GAT	3092
	Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg Leu Asp	
	985 990 995	
30	CCC GTG CTT CGG AAA ACT GCA AAT CTA GGA AGT TGG CAG ATT ATC AGT	3140
	Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile Ile Ser	
	1000 1005 1010	
35	CCA GTT GAA GCC GTT GGA TAT GTT GTC GTT GTG GAT GAG TTG CTT TCA	3188
	Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ser	
	1015 1020 1025	
40	GTT CAG AAT GAA ATC TAC GAG AAG CCC ACG ATC TTA GTA GCA AAA TCT	3236
	Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser	
	1030 1035 1040	
45	GTT AAA GGA GAG GAG GAA ATT CCT GAT GGT GCT GTT GCC CTG ATA ACA	3284
	Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu Ile Thr	
	1045 1050 1055 1060	
50	CCA GAC ATG CCA GAT GTT CTT TCA CAT GTT TCT GTT CGA GCT AGA AAT	3332
	Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn	
	1065 1070 1075	
55	GGG AAG GTT TGC TTT GCT ACA TGC TTT GAT CCC AAT ATA TTG GCT GAC	3380
	Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asp	
	1080 1085 1090	
60	CTC CAA GCA AAG GAA GGA AGG ATT TTG CTC TTA AAG CCT ACA CCT TCA	3428
	Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser	
	1095 1100 1105	
65	GAC ATA ATC TAT AGT GAG GTG AAT GAG ATT GAG CTC CAA AGT TCA AGT	3476
	Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser	
	1110 1115 1120	

DE 196 53 176 A 1

AAC TTG GTA GAA GCT GAA ACT TCA GCA ACA CTT AGA TTG GTG AAA AAG Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Lys 1125 1130 1135 1140	3524	
CAA TTT GGT GGT TGT TAC GCA ATA TCA GCA GAT GAA TTC ACA AGT GAA Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu 1145 1150 1155	3572	5
ATG GTT GGA GCT AAA TCA CGT AAT ATT GCA TAT CTG AAA GGA AAA GTG Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val 1160 1165 1170	3620	10
CCT TCC TCG GTG GGA ATT CCT ACG TCA GTA GCT CTT CCA TTT GGA GTC Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val 1175 1180 1185	3668	15
TTT GAG AAA GTA CTT TCA GAC GAC ATA AAT CAG GGA GTG GCA AAA GAG Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys Glu 1190 1195 1200	3716	20
TTG CAA ATT CTG ATG AAA AAA CTA TCT GAA GGA GAC TTC AGC GCT CTT Leu Gln Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser Ala Leu 1205 1210 1215 1220	3764	25
GGT GAA ATT CGC ACA ACG GTT TTA GAT CTT TCA GCA CCA GCT CAA TTG Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala Pro Ala Gln Leu 1225 1230 1235	3812	30
GTC AAA GAG CTG AAG GAG AAG ATG CAG GGT TCT GGC ATG CCT TGG CCT Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro 1240 1245 1250	3860	35
GGT GAT GAA GGT CCA AAG CGG TGG GAA CAA GCA TGG ATG GCC ATA AAA Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys 1255 1260 1265	3908	40
AAG GTG TGG GCT TCA AAA TGG AAT GAG AGA GCA TAC TTC AGC ACA AGG Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg 1270 1275 1280	3956	45
AAG GTG AAA CTG GAT CAT GAC TAT CTG TGC ATG GCT GTC CTT GTT CAA Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu Val Gln 1285 1290 1295 1300	4004	50
GAA ATA ATA AAT GCT GAT TAT GCA TTT GTC ATT CAC ACA ACC AAC CCA Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro 1305 1310 1315	4052	55
TCT TCC GGA GAC GAC TCA GAA ATA TAT GCC GAG GTG GTC AGG GGC CTT Ser Ser Gly Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg Gly Leu 1320 1325 1330	4100	60
GGG GAA ACA CTT GTT GGA GCT TAT CCA GGA CGT GCT TTG AGT TTT ATC Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile 1335 1340 1345	4148	65

DE 196 53 176 A 1

TGC AAG AAA AAG GAT CTC AAC TCT CCT CAA GTG TTA GGT TAC CCA AGC 4196
 Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser
 1350 1355 1360
 5
 AAA CCG ATC GGC CTT TTC ATA AAA AGA TCT ATC ATC TTC CGA TCT GAT 4244
 Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp
 1365 1370 1375 1380
 10
 TCC AAT GGG GAA GAT TTG GAA GGT TAT GCC GGT GCT GGC CTC TAC GAC 4292
 Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp
 1385 1390 1395
 15
 AGT GTA CCA ATG GAT GAG GAG GAA AAA GTT GTA ATT GAT TAC TCT TCC 4340
 Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser
 1400 1405 1410
 20
 GAC CCA TTG ATA ACT GAT GGT AAC TTC CGC CAG ACA ATC CTG TCC AAC 4388
 Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn
 1415 1420 1425
 25
 ATT GCT CGT GCT GGA CAT GCT ATC GAG GAG CTA TAT GGC TCT CCT CAA 4436
 Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln
 1430 1435 1440
 30
 GAC ATT GAG GGT GTA GTG AGG GAT GGA AAG ATT TAT GTC GTT CAG ACA 4484
 Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr
 1445 1450 1455 1460
 AGA CCA CAG ATG T GATTATATTC TCGTTGTATG TTGTTTCAGAG AAGACCACAG 4537
 Arg Pro Gln Met
 35
 ATGTGATCAT ATTCTCATTG TATCAGATCT GTGACCACTT ACCTGATACC TCCCATGAAG 4597
 TTACCTGTAT GATTATACGT GATCCAAAGC CATCACATCA TGTTACACCTT CAGCTATTGG 4657
 40
 AGGAGAAGTG AGAAGTAGGA ATTGCAATAT GAGGAATAAT AAGAAAAACT TTGTAAAAGC 4717
 TAAATTAGCT GGGTATGATA TAGGGAGAAA TGTGTAAACA TTGTACTATA TATAGTATAT 4777
 45
 ACACACGCAT TATGTATTGC ATTATGCACT GAATAATATC GCAGCATCAA AGAAGAAATC 4837
 CTTTGGGTGG TTTCAAAAA 4856

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 1464 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 55 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

60

65

DE 196 53 176 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Ser	Asn	Ser	Leu	Gly	Asn	Asn	Leu	Leu	Tyr	Gln	Gly	Phe	Leu	Thr	5
1				5					10					15		
Ser	Thr	Val	Leu	Glu	His	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Pro	Pro	Cys	Val	Gly	
			20					25					30			
Gly	Asn	Ser	Leu	Phe	Gln	Gln	Gln	Val	Ile	Ser	Lys	Ser	Pro	Leu	Ser	10
		35					40					45				
Thr	Glu	Phe	Arg	Gly	Asn	Arg	Leu	Lys	Val	Gln	Lys	Lys	Lys	Ile	Pro	
	50					55					60					15
Met	Glu	Lys	Lys	Arg	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Ala	Val	Leu	Thr	
65					70					75				80		
Thr	Asp	Thr	Ser	Ser	Glu	Leu	Ala	Glu	Lys	Phe	Ser	Leu	Gly	Gly	Asn	20
				85					90					95		
Ile	Glu	Leu	Gln	Val	Asp	Val	Arg	Pro	Pro	Thr	Ser	Gly	Asp	Val	Ser	
			100					105					110			25
Phe	Val	Asp	Phe	Gln	Val	Thr	Asn	Gly	Ser	Asp	Lys	Leu	Phe	Leu	His	
		115					120					125				
Trp	Gly	Ala	Val	Lys	Phe	Gly	Lys	Glu	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Asn	Asp	30
	130					135					140					
Arg	Pro	Asp	Gly	Thr	Lys	Val	Tyr	Lys	Asn	Lys	Ala	Leu	Arg	Thr	Pro	
145					150					155					160	
Phe	Val	Lys	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Ile	Leu	Arg	Leu	Glu	Ile	Arg	Asp	35
				165					170					175		
Thr	Ala	Ile	Glu	Ala	Ile	Glu	Phe	Leu	Ile	Tyr	Asp	Glu	Ala	His	Asp	
			180					185					190			40
Lys	Trp	Ile	Lys	Asn	Asn	Gly	Gly	Asn	Phe	Arg	Val	Lys	Leu	Ser	Arg	
		195				200						205				
Lys	Glu	Ile	Arg	Gly	Pro	Asp	Val	Ser	Val	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Gln	45
	210					215					220					
Ile	Gln	Ser	Tyr	Leu	Arg	Trp	Glu	Arg	Lys	Gly	Lys	Gln	Asn	Tyr	Pro	
225					230					235				240		50
Pro	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Glu	Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Val	Leu	Gln	
				245					250					255		
Glu	Glu	Ile	Ala	Arg	Gly	Ala	Ser	Ile	Gln	Asp	Ile	Arg	Ala	Arg	Leu	55
			260					265					270			
Thr	Lys	Thr	Asn	Asp	Lys	Ser	Gln	Ser	Lys	Glu	Glu	Pro	Leu	His	Val	
			275				280					285				60

DE 196 53 176 A 1

	Thr	Lys	Ser	Asp	Ile	Pro	Asp	Asp	Leu	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Tyr	Ile	
	290						295					300					
5	Arg	Trp	Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Pro	Asn	Tyr	Pro	Pro	Glu	Lys	Gln	Ile	
	305					310					315					320	
	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Ala	Arg	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	
					325					330					335		
10	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Lys	Thr	Ile	Thr	Lys	Gly	Glu	Ile	
				340					345					350			
15	Lys	Thr	Lys	Val	Glu	Lys	His	Leu	Lys	Arg	Ser	Ser	Phe	Ala	Val	Glu	
			355					360					365				
	Arg	Ile	Gln	Arg	Lys	Lys	Arg	Asp	Phe	Gly	His	Leu	Ile	Asn	Lys	Tyr	
	370						375					380					
20	Thr	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Gln	Val	Gln	Lys	Val	Leu	Glu	Glu	Pro	Pro	
	385					390					395					400	
25	Ala	Leu	Ser	Lys	Ile	Lys	Leu	Tyr	Ala	Lys	Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Ile	
					405					410					415		
	Asp	Asp	Pro	Ile	Leu	Asn	Lys	Lys	Ile	Phe	Lys	Val	Asp	Asp	Gly	Glu	
				420					425					430			
30	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Ala	Lys	Ser	Ser	Gly	Lys	Thr	Lys	Val	His	Leu	
			435					440					445				
35	Ala	Thr	Asp	Leu	Asn	Gln	Pro	Ile	Thr	Leu	His	Trp	Ala	Leu	Ser	Lys	
	450						455					460					
	Ser	Pro	Gly	Glu	Trp	Met	Val	Pro	Pro	Ser	Ser	Ile	Leu	Pro	Pro	Gly	
	465					470					475					480	
40	Ser	Ile	Ile	Leu	Asp	Lys	Ala	Ala	Glu	Thr	Pro	Phe	Ser	Ala	Ser	Ser	
					485					490					495		
45	Ser	Asp	Gly	Leu	Thr	Ser	Lys	Val	Gln	Ser	Leu	Asp	Ile	Val	Ile	Glu	
				500					505					510			
	Asp	Gly	Asn	Phe	Val	Gly	Met	Pro	Phe	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Glu	Lys	
			515					520					525				
50	Trp	Ile	Lys	Asn	Gln	Gly	Ser	Asp	Phe	Tyr	Val	Gly	Phe	Ser	Ala	Ala	
	530						535					540					
	Ser	Lys	Leu	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Lys	
	545					550					555					560	
55	Ser	Leu	Leu	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Met	Glu	Ser	Glu	Ala	Gln	Lys	Ser	
					565					570					575		
60	Phe	Met	His	Arg	Phe	Asn	Ile	Ala	Ala	Asp	Leu	Ile	Glu	Asp	Ala	Thr	
				580					585					590			

65

DE 196 53 176 A 1

Ser	Ala	Gly	Glu	Leu	Gly	Phe	Ala	Gly	Ile	Leu	Val	Trp	Met	Arg	Phe				
	595						600					605							
Met	Ala	Thr	Arg	Gln	Leu	Ile	Trp	Asn	Lys	Asn	Tyr	Asn	Val	Lys	Pro				5
	610					615					620								
Arg	Glu	Ile	Ser	Lys	Ala	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Gln	Asn				
625					630					635					640				10
Ala	Phe	Thr	Ser	His	Pro	Gln	Tyr	Arg	Glu	Ile	Leu	Arg	Met	Ile	Met				
				645					650					655					
Ser	Thr	Val	Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Gly	Gln	Arg	Ile	Arg				15
			660					665					670						
Asp	Glu	Ile	Leu	Val	Ile	Gln	Arg	Asn	Asn	Asp	Cys	Lys	Gly	Gly	Met				
	675					680					685								20
Met	Gln	Glu	Trp	His	Gln	Lys	Leu	His	Asn	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Asp				
	690					695					700								
Val	Val	Ile	Cys	Gln	Ala	Leu	Ile	Asp	Tyr	Ile	Lys	Ser	Asp	Phe	Asp				25
705					710					715					720				
Leu	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys	Thr	Leu	Asn	Glu	Asn	Gly	Ile	Thr	Lys	Glu				
				725					730					735					
Arg	Leu	Leu	Ser	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	His	Ser	Glu	Pro	Asn	Phe	Arg				30
			740					745					750						
Gly	Asp	Gln	Lys	Gly	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Gly	His	Tyr	Met	Arg				
	755					760						765							35
Thr	Leu	Lys	Ala	Val	His	Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	Ala				
	770					775					780								
Asn	Cys	Met	Gly	Tyr	Lys	Thr	Glu	Gly	Glu	Gly	Phe	Met	Val	Gly	Val				40
785					790				795					800					
Gln	Ile	Asn	Pro	Val	Ser	Gly	Leu	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Asp	Leu	Leu				
			805					810						815					45
His	Phe	Val	Leu	Asp	His	Val	Glu	Asp	Lys	Asn	Val	Glu	Thr	Leu	Leu				
			820				825					830							
Glu	Arg	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Lys				50
	835					840					845								
Pro	Asn	Asn	Arg	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Leu	Asp	Ile	Ala	Leu	Asp				
	850					855					860								
Ser	Thr	Val	Arg	Thr	Ala	Val	Glu	Arg	Gly	Tyr	Glu	Glu	Leu	Asn	Asn				55
865					870				875					880					

60

65

DE 196 53 176 A 1

	Ala Asn Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn	885	890	895
5	Leu Ala Leu Ser Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys	900	905	910
	Gly Trp Asn Gln Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp	915	920	925
10	Ala Leu Phe Ala Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala	930	935	940
15	Ser Lys Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr	945	950	955
	Leu Gly Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr	965	970	975
20	Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu	980	985	990
25	Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp	995	1000	1005
	Gln Ile Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp	1010	1015	1020
30	Glu Leu Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu	1025	1030	1035
	Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val	1045	1050	1055
35	Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val	1060	1065	1070
40	Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn	1075	1080	1085
	Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys	1090	1095	1100
45	Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu	1105	1110	1115
50	Gln Ser Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg	1125	1130	1135
	Leu Val Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu	1140	1145	1150
55	Phe Thr Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu	1155	1160	1165
60	Lys Gly Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu	1170	1175	1180

65

DE 196 53 176 A 1

Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly 1185 1190 1195 1200	
Val Ala Lys Glu Leu Gln Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp 1205 1210 1215	5
Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala 1220 1225 1230	
Pro Ala Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly 1235 1240 1245	10
Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp 1250 1255 1260	15
Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr 1265 1270 1275 1280	
Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala 1285 1290 1295	20
Val Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His 1300 1305 1310	25
Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val 1315 1320 1325	
Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala 1330 1335 1340	30
Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu 1345 1350 1355 1360	35
Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile 1365 1370 1375	
Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala 1380 1385 1390	40
Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile 1395 1400 1405	45
Asp Tyr Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr 1410 1415 1420	
Ile Leu Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr 1425 1430 1435 1440	50
Gly Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr 1445 1450 1455	
Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met 1460	55
	60
	65

DE 196 53 176 A 1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1918 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
- (B) STAMM: C.V. Desiree

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:1..1555

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCA GAG TGG TAC CAT CAC TTA TTG CAG CCA TCT GCC GAA TAT CTA GGA	48
Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly	
1 5 10 15	
TCA ATA CTT GGG GTG GAC CAA TGG GCT TTG AAC ATA TTT ACT GAA GAA	96
Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu	
20 25 30	
ATT ATA CGT GCT GGA TCA GCA GCT TCA TTA TCC TCT CTT CTT AAT AGA	144
Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg	
35 35 40 45	
CTC GAT CCC GTG CTT CGG AAA ACT GCA AAT CTA GGA AGT TGG CAG ATT	192
Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile	
50 55 60	
ATC AGT CCA GTT GAA GCC GTT GGA TAT GTT GTC GTT GTG GAT GAG TTG	240
Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu	
65 70 75 80	
CTT TCA GTT CAG AAT GAA ATC TAC GAG AAG CCC ACG ATC TTA GTA GCA	288
Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala	
85 90 95	
AAA TCT GTT AAA GGA GAG GAG GAA ATT CCT GAT GGT GCT GTT GCC CTG	336
Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu	
100 105 110	
ATA ACA CCA GAC ATG CCA GAT GTT CTT TCA CAT GTT TCT GTT CGA GCT	384
Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala	
115 120 125	
AGA AAT GGG AAG GTT TGC TTT GCT ACA TGC TTT GAT CCC AAT ATA TTG	432
Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu	
130 135 140	

DE 196 53 176 A 1

GCT GAC CTC CAA GCA AAG GAA GGA AGG ATT TTG CTC TTA AAG CCT ACA Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr 145 150 155 160	480	
CCT TCA GAC ATA ATC TAT AGT GAG GTG AAT GAG ATT GAG CTC CAA AGT Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser 165 170 175	528	5
TCA AGT AAC TTG GTA GAA GCT GAA ACT TCA GCA ACA CTT AGA TTG GTG Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val 180 185 190	576	10
AAA AAG CAA TTT GGT GGT TGT TAC GCA ATA TCA GCA GAT GAA TTC ACA Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr 195 200 205	624	15
AGT GAA ATG GTT GGA GCT AAA TCA CGT AAT ATT GCA TAT CTG AAA GGA Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly 210 215 220	672	20
AAA GTG CCT TCC TCG GTG GGA ATT CCT ACG TCA GTA GCT CTT CCA TTT Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe 225 230 235 240	720	25
GGA GTC TTT GAG AAA GTA CTT TCA GAC GAC ATA AAT CAG GGA GTG GCA Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala 245 250 255	768	30
AAA GAG TTG CAA ATT CTG ACA AAA AAA CTA TCT GAA GGA GAC TTT AGC Lys Glu Leu Gln Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser 260 265 270	816	35
GCT CTT GGT GAA ATT CGC ACA ACG GTT TTA GAT CTT TCG ACA CCA GCT Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Thr Pro Ala 275 280 285	864	40
CAA TTG GTC AAA GAG CTG AAG GAG AAG ATG CAG GGT TCT GGC ATG CCT Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro 290 295 300	912	45
TGG CCT GGT GAT GAA GGT CCA AAG CGG TGG GAA CAA GCA TGG ATG GCC Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala 305 310 315 320	960	50
ATA AAA AAG GTG TGG GCT TCA AAA TGG AAT GAG AGA GCA TAC TTC AGC Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser 325 330 335	1008	55
ACA AGG AAG GTG AAA CTG GAT CAT GAC TAT CTG TGC ATG GCT GTC CTT Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu 340 345 350	1056	60
GTT CAA GAA ATA ATA AAT GCT GAT TAT GCA TTT GTC ATT CAC ACA ACC Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr 355 360 365	1104	65

DE 196 53 176 A 1

	AAC CCA TCT TCC GGA GAC GAC TCA GAA ATA TAT GCC GAG GTG GTC AGG	1152
	Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg	
	370 375 380	
5	GGC CTT GGG GAA ACA CTT GTT GGA GCT TAT CCA GGA CGT GCT TTG AGT	1200
	Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser	
	385 390 395 400	
10	TTT ATC TGC AAG AAA AAG GAT CTC AAC TCT CCT CAA GTG TTA GGT TAC	1248
	Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr	
	405 410 415	
15	CCA AGC AAA CCG ATC GGC CTT TTC ATA AAA AGA TCT ATC ATC TTC CGA	1296
	Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg	
	420 425 430	
20	TCT GAT TCC AAT GGG GAA GAT TTG GAA GGT TAT GCC GGT GCT GGC CTC	1344
	Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu	
	435 440 445	
25	TAC GAC AGT GTA CCA ATG GAT GAG GAG GAA AAA GTT GTA ATT GAT TAC	1392
	Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr	
	450 455 460	
30	TCT TCC GAC CCA TTG ATA ACT GAT GGT AAC TTC CGC CAG ACA ATC CTG	1440
	Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu	
	465 470 475 480	
	TCC AAC ATT GCT CGT GCT GGA CAT GCT ATC GAG GAG CTA TAT GGC TCT	1488
	Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser	
	485 490 495	
35	CCT CAA GAC ATT GAG GGT GTA GTG AGG GAT GGA AAG ATT TAT GTC GTT	1536
	Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val	
	500 505 510	
40	CAG ACA AGA CCA CAG ATG T GATTATATTC TCGTTGTATG TTGTTTCAGAG	1585
	Gln Thr Arg Pro Gln Met	
	515	
45	AAGACCACAG ATGTGATCAT ATTCTCATTG TATCAGATCT GTGACCACTT ACCTGATACC	1645
	TCCCATGAAG TTACCTGTAT GATTATACGT GATCCAAAGC CATCACATCA TGTTACCTT	1705
	CAGCTATTGG AGGAGAAGTG AGAAGTAGCA ATTGCAATAT GAGGAATAAT AAGAAAAACT	1765
50	TTGTAAAAGC TAAATTAGCT GGGTATGATA TAGGGAGAAA TGTGTAAACA TTGTACTATA	1825
	TATAGTATAT ACACACGCAT TATGTATTGC ATTATGCACT GAATAATATC GCAGCATCAA	1885
55	AGAAGAAATC CTTTGGGTGG TTTCAAAAAA AAA	1918

DE 196 53 176 A 1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 518 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Ala	Glu	Trp	Tyr	His	His	Leu	Leu	Gln	Pro	Ser	Ala	Glu	Tyr	Leu	Gly	
1					5				10					15		
Ser	Ile	Leu	Gly	Val	Asp	Gln	Trp	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Thr	Glu	Glu	15
			20					25					30			
Ile	Ile	Arg	Ala	Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Asn	Arg	
		35					40					45				20
Leu	Asp	Pro	Val	Leu	Arg	Lys	Thr	Ala	Asn	Leu	Gly	Ser	Trp	Gln	Ile	
	50					55					60					
Ile	Ser	Pro	Val	Glu	Ala	Val	Gly	Tyr	Val	Val	Val	Val	Asp	Glu	Leu	25
65					70				75						80	
Leu	Ser	Val	Gln	Asn	Glu	Ile	Tyr	Glu	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu	Val	Ala	
				85					90					95		
Lys	Ser	Val	Lys	Gly	Glu	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp	Gly	Ala	Val	Ala	Leu	30
			100					105					110			
Ile	Thr	Pro	Asp	Met	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	His	Val	Ser	Val	Arg	Ala	
		115					120					125				35
Arg	Asn	Gly	Lys	Val	Cys	Phe	Ala	Thr	Cys	Phe	Asp	Pro	Asn	Ile	Leu	
	130					135					140					
Ala	Asp	Leu	Gln	Ala	Lys	Glu	Gly	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Pro	Thr	40
145					150				155					160		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ile	Tyr	Ser	Glu	Val	Asn	Glu	Ile	Glu	Leu	Gln	Ser	
				165					170					175		45
Ser	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu	Arg	Leu	Val	
			180					185					190			
Lys	Lys	Gln	Phe	Gly	Gly	Cys	Tyr	Ala	Ile	Ser	Ala	Asp	Glu	Phe	Thr	50
		195				200						205				
Ser	Glu	Met	Val	Gly	Ala	Lys	Ser	Arg	Asn	Ile	Ala	Tyr	Leu	Lys	Gly	
	210					215					220					55
Lys	Val	Pro	Ser	Ser	Val	Gly	Ile	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Leu	Pro	Phe	
225					230					235				240		

DE 196 53 176 A 1

Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala
 245 250 255
 5 Lys Glu Leu Gln Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser
 260 265 270
 Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Thr Pro Ala
 275 280 285
 10 Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro
 290 295 300
 15 Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala
 305 310 315 320
 Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser
 325 330 335
 20 Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu
 340 345 350
 25 Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr
 355 360 365
 Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg
 370 375 380
 30 Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser
 385 390 395 400
 35 Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr
 405 410 415
 Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg
 420 425 430
 40 Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu
 435 440 445
 45 Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr
 450 455 460
 Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu
 465 470 475 480
 50 Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser
 485 490 495
 Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val
 500 505 510
 55 Gln Thr Arg Pro Gln Met
 515

60

65

DE 196 53 176 A 1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2307 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Zea mays

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:33..1943

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TAGTGGATCC CCCCAGGCTG CAGGGAATTC GG CAC GAG CTT GAG GGG CTA TTG	53
His Glu Leu Glu Gly Leu Leu	30
1 5	
GAA GCT CGA GTT GAA CTG CGC CCT TTG CTT CTT GAT TCG CGT GAA CGC	101
Glu Ala Arg Val Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Asp Ser Arg Glu Arg	35
10 15 20	
ATG AAA GAT CTT ATA TTT TTG GAC ATT GCT CTT GAT TCT ACC TTC AGG	149
Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe Arg	40
25 30 35	
ACA GCA ATT GAA AGG TCA TAT GAG GAG CTG AAT GAT GCA GCC CCA GAG	197
Thr Ala Ile Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asp Ala Ala Pro Glu	45
40 45 50 55	
AAA ATA ATG TAC TTC ATC AGT CTT GTC CTT GAA AAT CTT GCG CTT TCA	245
Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser	50
60 65 70	
ATT GAC GAC AAT GAA GAC ATC CTG TAT TGT TTA AAG GGA TGG AAC CAA	293
Ile Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln	55
75 80 85	
GCC TTG GAA ATG GCT AAG CAA AAA GAC GAC CAA TGG GCG CTC TAT GCT	341
Ala Leu Glu Met Ala Lys Gln Lys Asp Asp Gln Trp Ala Leu Tyr Ala	60
90 95 100	

DE 196 53 176 A 1

	AAA GCA TTT CTT GAC AGA AAC AGA CTT GCC CTT GCG AGC AAG GGA GAA	389
	Lys Ala Phe Leu Asp Arg Asn Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly Glu	
	105 110 115	
5	CAA TAC CAT AAT ATG ATG CAG CCC TCT GCT GAG TAT CTT GGC TCG TTA	437
	Gln Tyr His Asn Met Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu	
	120 125 130 135	
10	CTC AGC ATA GAC CAA TGG GCA GTC AAT ATC TTC ACA GAA GAA ATT ATA	485
	Leu Ser Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile	
	140 145 150	
15	CGC GGT GGA TCA GCT GCT ACT CTG TCT GCT CTT CTG AAC CGA TTT GAT	533
	Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Phe Asp	
	155 160 165	
20	CCT GTT TTA AGG AAT GTT GCT CAC CTC GGA AGT TGG CAG GTT ATA AGC	581
	Pro Val Leu Arg Asn Val Ala His Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser	
	170 175 180	
25	CCG GTT GAA GTA TCA GGT TAT GTG GTT GTG GTT GAT GAG TTA CTT GCT	629
	Pro Val Glu Val Ser Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ala	
	185 190 195	
30	GTC CAG AAC AAA TCT TAT GAT AAA CCA ACC ATC CTT GTG GCA AAG AGT	677
	Val Gln Asn Lys Ser Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser	
	200 205 210 215	
35	GTC AAG GGA GAG GAA GAA ATA CCA GAT GGA GTA GTT GGT GTA ATT ACA	725
	Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr	
	220 225 230	
40	CCT GAT ATG CCA GAT GTT CTG TCT CAT GTG TCA GTC CGA GCA AGG AAT	773
	Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn	
	235 240 245	
45	AGC AAG GTA CTG TTT GCG ACC TGT TTT GAC CAC ACC ACT CTA TCT GAA	821
	Ser Lys Val Leu Phe Ala Thr Cys Phe Asp His Thr Thr Leu Ser Glu	
	250 255 260	
50	CTT GAA GGA TAT GAT CAG AAA CTG TTT TCC TTC AAG CCT ACT TCT GCA	869
	Leu Glu Gly Tyr Asp Gln Lys Leu Phe Ser Phe Lys Pro Thr Ser Ala	
	265 270 275	
55	GAT ATA ACC TAT AGG GAG ATC ACA GAG AGT GAA CTT CAG CAA TCA AGT	917
	Asp Ile Thr Tyr Arg Glu Ile Thr Glu Ser Glu Leu Gln Gln Ser Ser	
	280 285 290 295	
60	TCT CCA AAT GCA GAA GTT GGC CAT GCA GTA CCA TCT ATT TCA TTG GCC	965
	Ser Pro Asn Ala Glu Val Gly His Ala Val Pro Ser Ile Ser Leu Ala	
	300 305 310	
65		

DE 196 53 176 A 1

AAG AAG AAA TTT CTT GGA AAA TAT GCA ATA TCA GCC GAA GAA TTC TCT Lys Lys Lys Phe Leu Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Glu Glu Phe Ser 315 320 325	1013	
GAG GAA ATG GTT GGG GCC AAG TCT CGG AAT ATA GCA TAC CTC AAA GGA Glu Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly 330 335 340	1061	5
AAA GTA CCT TCA TGG GTC GGT GTC CCA ACG TCA GTT GCG ATA CCA TTT Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Val Pro Thr Ser Val Ala Ile Pro Phe 345 350 355	1109	10
GGC ACT TTT GAG AAG GTT TTG TCA GAT GGG CTT AAT AAG GAA GTA GCA Gly Thr Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Gly Leu Asn Lys Glu Val Ala 360 365 370 375	1157	15
CAG AGC ATA GAG AAG CTT AAG ATC AGA CTT GCC CAA GAA GAT TTT AGT Gln Ser Ile Glu Lys Leu Lys Ile Arg Leu Ala Gln Glu Asp Phe Ser 380 385 390	1205	20
GCT CTA GGT GAA ATA AGA AAA GTC GTC CTT AAT CTT ACT GCT CCT ATG Ala Leu Gly Glu Ile Arg Lys Val Val Leu Asn Leu Thr Ala Pro Met 395 400 405	1253	25
CAA TTG GTT AAT GAG CTG AAG GAG AGG ATG CTA GGC TCT GGA ATG CCC Gln Leu Val Asn Glu Leu Lys Glu Arg Met Leu Gly Ser Gly Met Pro 410 415 420	1301	30
TGG CCT GGT GAT GAA GGA GAC AAG CGT TGG GAG CAA GCA TGG ATG GCT Trp Pro Gly Asp Glu Gly Asp Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala 425 430 435	1349	35
ATT AAA AAG GTT TGG GCA TCA AAA TGG AAC GAA AGA GCA TAT TTT AGC Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser 440 445 450 455	1397	40
ACA CGC AAG GTG AAA CTT GAT CAT GAG TAC CTT TCG ATG GCT GTT CTC Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Glu Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu 460 465 470	1445	45
GTG CAA GAA GTT GTG AAT GCA GAT TAT GCT TTT GTC ATT CAT ACC ACA Val Gln Glu Val Val Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr 475 480 485	1493	50
AAC CCA TCG TCT GGA GAT TCT TCT GAG ATA TAT GCT GAA GTG GTG AAA Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys 490 495 500	1541	55
GGG CTT GGC GAG ACC CTC GTG GGA GCC TAT CCT GGT CGT GCT ATG AGC Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met Ser 505 510 515	1589	60

65

DE 196 53 176 A 1

5 TTT GTT TGC AAA AAA GAT GAC CTT GAC TCT CCC AAG TTA CTT GGT TAC 1637
 Phe Val Cys Lys Lys Asp Asp Leu Asp Ser Pro Lys Leu Leu Gly Tyr
 520 525 530 535
 CCA AGC AAG CCA ATT GGT CTC TTC ATA AGG CAA TCA ATC ATC TTC CGT 1685
 Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg Gln Ser Ile Ile Phe Arg
 540 545 550
 10 TCC GAC TCC AAC GGT GAG GAC CTG GAA GGT TAT GCT GGA GCA GGA TTA 1733
 Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu
 555 560 565
 15 TAT GAT AGT GTA CCG ATG GAT GAG GAG GAT GAG GTT GTA CTT GAT TAT 1781
 Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Asp Glu Val Val Leu Asp Tyr
 570 575 580
 20 ACA ACT GAC CCT CTT ATA GTA GAC CGT GGA TTC CGA AGC TCA ATC CTC 1829
 Thr Thr Asp Pro Leu Ile Val Asp Arg Gly Phe Arg Ser Ser Ile Leu
 585 590 595
 25 TCA AGC ATA GCA CGG GCT GGC CAT GCC ATC GAG GAG CTA TAT GGT TCT 1877
 Ser Ser Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser
 600 605 610 615
 30 CCT CAG GAC GTC GAG GGA GTA GTG AAG GAT GGA AAA ATC TAT GTA GTC 1925
 Pro Gln Asp Val Glu Gly Val Val Lys Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val
 620 625 630
 CAG ACA AGA CCA CAG ATG TAGTATGTAT GCATCTATTA GACAGCTCAA 1973
 35 Gln Thr Arg Pro Gln Met
 635
 TAAGCACTGT TGTACGCTTG TATGGTTGGG ACATATGGGC GTTATGGCAT GTATAGTTGT 2033
 40 ATGCCTAGAT GTACAACACG TGTACTCGTA TATATATATA TAAATGCTGA AACAAGCATT 2093
 GGTCCTGTAC TGTAGTTTCT ACATTTTCATT GTCACCAATA ATTAAGTGTA CTCCTATGGC 2153
 45 TGGGAGTCTA TGAAAATGGA CGTGTGACT TATTGGGTAA TAAATAATTT ATATATAAAA 2213
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA CTCGAGGGGG 2273
 GGCCGGTCCC AATTCGCCTA TAGTGAGTCG TATA 2307
 50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

55 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 637 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 60 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

65

DE 196 53 176 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

His	Glu	Leu	Glu	Gly	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg	Val	Glu	Leu	Arg	Pro	Leu	5
1				5					10					15		
Leu	Leu	Asp	Ser	Arg	Glu	Arg	Met	Lys	Asp	Leu	Ile	Phe	Leu	Asp	Ile	
			20					25					30			
Ala	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Arg	Thr	Ala	Ile	Glu	Arg	Ser	Tyr	Glu	Glu	10
			35				40					45				
Leu	Asn	Asp	Ala	Ala	Pro	Glu	Lys	Ile	Met	Tyr	Phe	Ile	Ser	Leu	Val	15
	50					55				60						
Leu	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Ile	Asp	Asp	Asn	Glu	Asp	Ile	Leu	Tyr	
65					70				75					80		
Cys	Leu	Lys	Gly	Trp	Asn	Gln	Ala	Leu	Glu	Met	Ala	Lys	Gln	Lys	Asp	20
				85					90					95		
Asp	Gln	Trp	Ala	Leu	Tyr	Ala	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	Arg	Asn	Arg	Leu	25
			100					105					110			
Ala	Leu	Ala	Ser	Lys	Gly	Glu	Gln	Tyr	His	Asn	Met	Met	Gln	Pro	Ser	
			115				120					125				
Ala	Glu	Tyr	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Ser	Ile	Asp	Gln	Trp	Ala	Val	Asn	30
	130					135					140					
Ile	Phe	Thr	Glu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Gly	Ser	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	35
145					150				155					160		
Ala	Leu	Leu	Asn	Arg	Phe	Asp	Pro	Val	Leu	Arg	Asn	Val	Ala	His	Leu	
			165					170				175				
Gly	Ser	Trp	Gln	Val	Ile	Ser	Pro	Val	Glu	Val	Ser	Gly	Tyr	Val	Val	40
			180					185					190			
Val	Val	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala	Val	Gln	Asn	Lys	Ser	Tyr	Asp	Lys	Pro	45
		195					200					205				
Thr	Ile	Leu	Val	Ala	Lys	Ser	Val	Lys	Gly	Glu	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp	
	210					215					220					
Gly	Val	Val	Gly	Val	Ile	Thr	Pro	Asp	Met	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	His	50
225					230				235					240		
Val	Ser	Val	Arg	Ala	Arg	Asn	Ser	Lys	Val	Leu	Phe	Ala	Thr	Cys	Phe	55
			245					250					255			
Asp	His	Thr	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Gly	Tyr	Asp	Gln	Lys	Leu	Phe	
			260					265					270			

60

65

DE 196 53 176 A 1

	Ser	Phe	Lys	Pro	Thr	Ser	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Ile	Thr	Glu	
			275					280					285				
5	Ser	Glu	Leu	Gln	Gln	Ser	Ser	Ser	Pro	Asn	Ala	Glu	Val	Gly	His	Ala	
		290					295					300					
10	Val	Pro	Ser	Ile	Ser	Leu	Ala	Lys	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly	Lys	Tyr	Ala	
	305					310					315					320	
	Ile	Ser	Ala	Glu	Glu	Phe	Ser	Glu	Glu	Met	Val	Gly	Ala	Lys	Ser	Arg	
				325					330						335		
15	Asn	Ile	Ala	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Trp	Val	Gly	Val	Pro	
			340						345					350			
20	Thr	Ser	Val	Ala	Ile	Pro	Phe	Gly	Thr	Phe	Glu	Lys	Val	Leu	Ser	Asp	
			355					360					365				
	Gly	Leu	Asn	Lys	Glu	Val	Ala	Gln	Ser	Ile	Glu	Lys	Leu	Lys	Ile	Arg	
		370					375					380					
25	Leu	Ala	Gln	Glu	Asp	Phe	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Ile	Arg	Lys	Val	Val	
	385				390						395					400	
30	Leu	Asn	Leu	Thr	Ala	Pro	Met	Gln	Leu	Val	Asn	Glu	Leu	Lys	Glu	Arg	
				405					410					415			
	Met	Leu	Gly	Ser	Gly	Met	Pro	Trp	Pro	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp	Lys	Arg	
			420					425						430			
35	Trp	Glu	Gln	Ala	Trp	Met	Ala	Ile	Lys	Lys	Val	Trp	Ala	Ser	Lys	Trp	
			435				440						445				
40	Asn	Glu	Arg	Ala	Tyr	Phe	Ser	Thr	Arg	Lys	Val	Lys	Leu	Asp	His	Glu	
	450					455						460					
	Tyr	Leu	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Val	Asn	Ala	Asp	Tyr	
	465				470					475					480		
45	Ala	Phe	Val	Ile	His	Thr	Thr	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Glu	
				485					490						495		
50	Ile	Tyr	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Val	Gly	Ala	
			500					505					510				
	Tyr	Pro	Gly	Arg	Ala	Met	Ser	Phe	Val	Cys	Lys	Lys	Asp	Asp	Leu	Asp	
			515					520					525				
55	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ser	Lys	Pro	Ile	Gly	Leu	Phe	Ile	
		530				535						540					
60	Arg	Gln	Ser	Ile	Ile	Phe	Arg	Ser	Asp	Ser	Asn	Gly	Glu	Asp	Leu	Glu	
	545				550						555					560	

65

Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu
565 570 575

Asp Glu Val Val Leu Asp Tyr Thr Thr Asp Pro Leu Ile Val Asp Arg
580 585 590

Gly Phe Arg Ser Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg Ala Gly His Ala
595 600 605

Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Val Glu Gly Val Val Lys
610 615 620

Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met
625 630 635

Patentansprüche

1. Nucleinsäuremolekül, das ein Protein aus Mais codiert, das in pflanzlichen Zellen sowohl an Stärkekörner gebunden vorliegt, als auch in löslicher Form, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - (a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter Seq ID No. 6 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
 - (b) Nucleinsäuremolekülen, die die codierende Region der unter Seq ID No. 5 angegebenen Nucleotidsequenz umfassen; und
 - (c) Nucleinsäuremolekülen, die mit dem komplementären Strang eines unter (a) oder (b) genannten Nucleinsäuremoleküls hybridisieren;
 sowie der jeweils komplementäre Strang eines solchen Nucleinsäuremoleküls.
2. Vektor enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1.
3. Vektor nach Anspruch 2, wobei das Nucleinsäuremolekül verknüpft ist mit regulatorischen Elementen, die die Transkription in eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen gewährleisten.
4. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder einem Vektor nach Anspruch 2 oder 3.
5. Wirtszelle nach Anspruch 4, die eine transgene Pflanzenzelle ist.
6. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 5.
7. Stärke erhältlich aus Pflanzenzellen nach Anspruch 5 oder einer Pflanze nach Anspruch 6.
8. Verfahren zur Herstellung eines Proteins aus Mais, bei dem eine Wirtszelle nach Anspruch 4 unter Bedingungen kultiviert wird, die die Expression des Proteins erlauben, und das Protein aus den Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.
9. Protein, das durch ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 codiert wird oder das erhältlich ist durch ein Verfahren nach Anspruch 8.
10. Antikörper, der spezifisch ein Protein nach Anspruch 9 erkennt.
11. Nucleinsäuremolekül von mindestens 15 Nucleotiden Länge, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 hybridisiert.
12. DNA-Molekül codierend eine antisense-BNA, die komplementär ist zu Transkripten eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1.
13. DNA-Molekül codierend eine BNA mit Ribozymaktivität, die spezifisch Transkripte eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1 spaltet.
14. DNA-Molekül, codierend eine BNA, die bei Expression in einer pflanzlichen Zelle aufgrund eines Cosuppressions-Effektes zur Verringerung der Expression eines Nucleinsäuremoleküls nach Anspruch 1 führt.
15. Vektor enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 12 bis 14.
16. Vektor nach Anspruch 15, wobei das DNA-Molekül kombiniert ist mit regulatorischen DNA-Elementen, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten.
17. Wirtszelle enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 12 bis 14 oder einen Vektor nach Anspruch 15 oder 16.
18. Transgene Pflanzenzelle enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 12 bis 14 in Kombination mit regulatorischen DNA-Elementen, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten.
19. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 18, bei der die Aktivität mindestens eines weiteren, an der Stärkebiosynthese oder -modifikation beteiligten Enzyms verringert ist im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen.
20. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 19, bei der die Aktivität eines Verzweigungsenzyms verringert ist.
21. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 20, bei der die Aktivität einer Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthase der Isoform I (GBSSI) verringert ist.
22. Transgene Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 18 bis 21.
23. Stärke erhältlich aus Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 18 bis 21 oder Pflanzen nach Anspruch 22.
24. BNA-Molekül erhältlich durch Transkription eines DNA Moleküls nach einem der Ansprüche 12 bis 14.
25. Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, dadurch

gekennzeichnet, daß in den Zellen die Menge von Proteinen nach Anspruch 10 verringert wird, die endogen in der Zelle synthetisiert werden.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Verringerung der Menge der Proteine nach Anspruch 10 in den Zellen durch einen antisense-Effekt erzielt wird.

27. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Verringerung der Menge der Proteine nach Anspruch 10 in den Zellen durch einen Ribozymeffekt erzielt wird.

28. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Verringerung der Menge der Proteine nach Anspruch 10 in den Zellen durch einen Cosuppressions-Effekt erzielt wird.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 28, wobei die Enzymaktivität mindestens eines weiteren an der Stärkebiosynthese und/oder Modifikation beteiligten Enzyms reduziert wird.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei das Enzym ein Verzweigungsenzym ist.

31. Verfahren nach Anspruch 29, wobei das Enzym eine Stärkekorn-gebundene Stärkesynthase der Isoform I (GBSST) ist.

32. Pflanzenzelle erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 31.

33. Transgene Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 32.

34. Stärke erhältlich aus Pflanzenzellen nach Anspruch 32 oder einer Pflanze nach Anspruch 33.

35. Stärke nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Mais stammt.

36. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach Anspruch 6 enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 5.

37. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach Anspruch 22 oder 32, enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 18 bis 21 oder nach Anspruch 32.

38. Transgene Pflanze nach Anspruch 22 oder 33, die eine Maispflanze ist.

39. Samen einer Maispflanze nach Anspruch 38.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

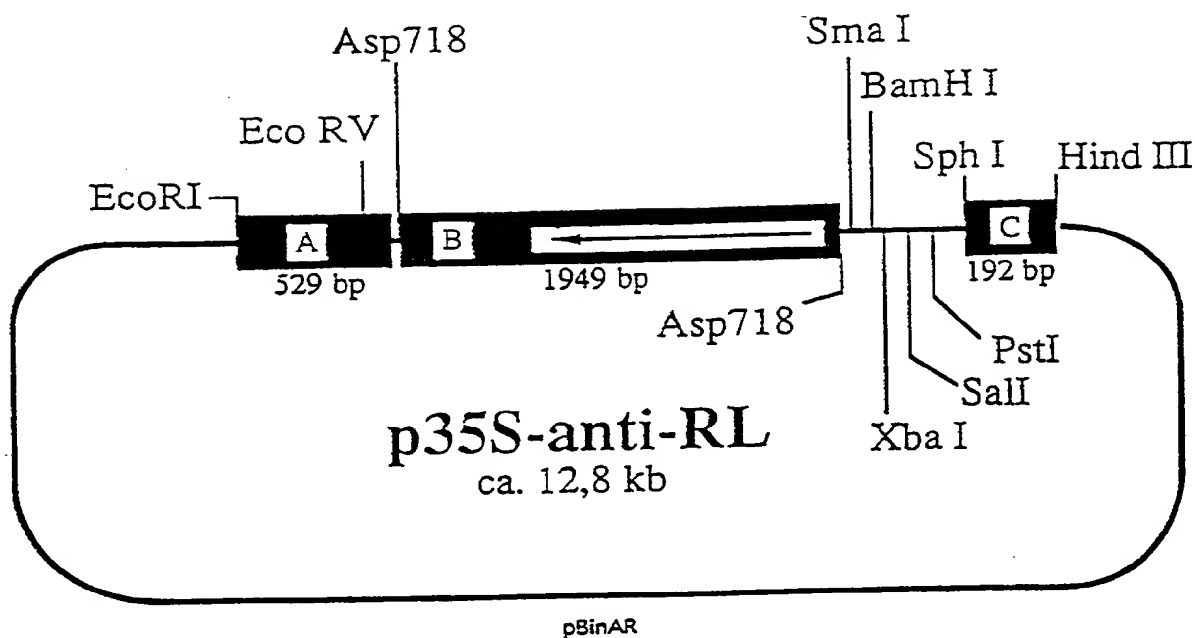


Fig. 1

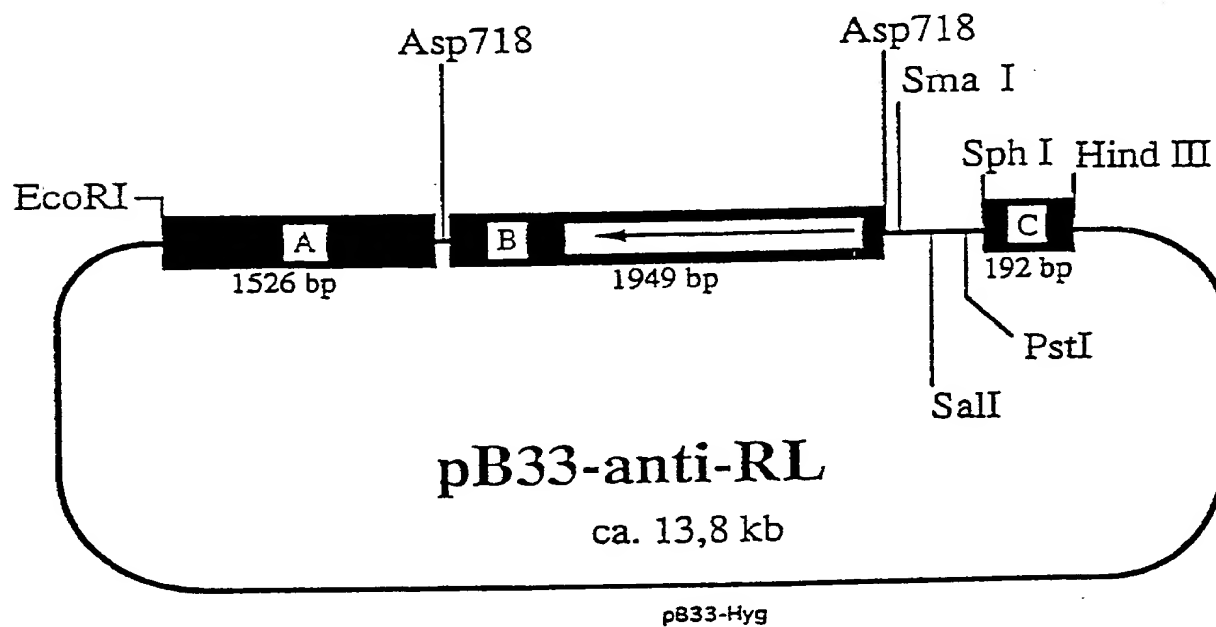
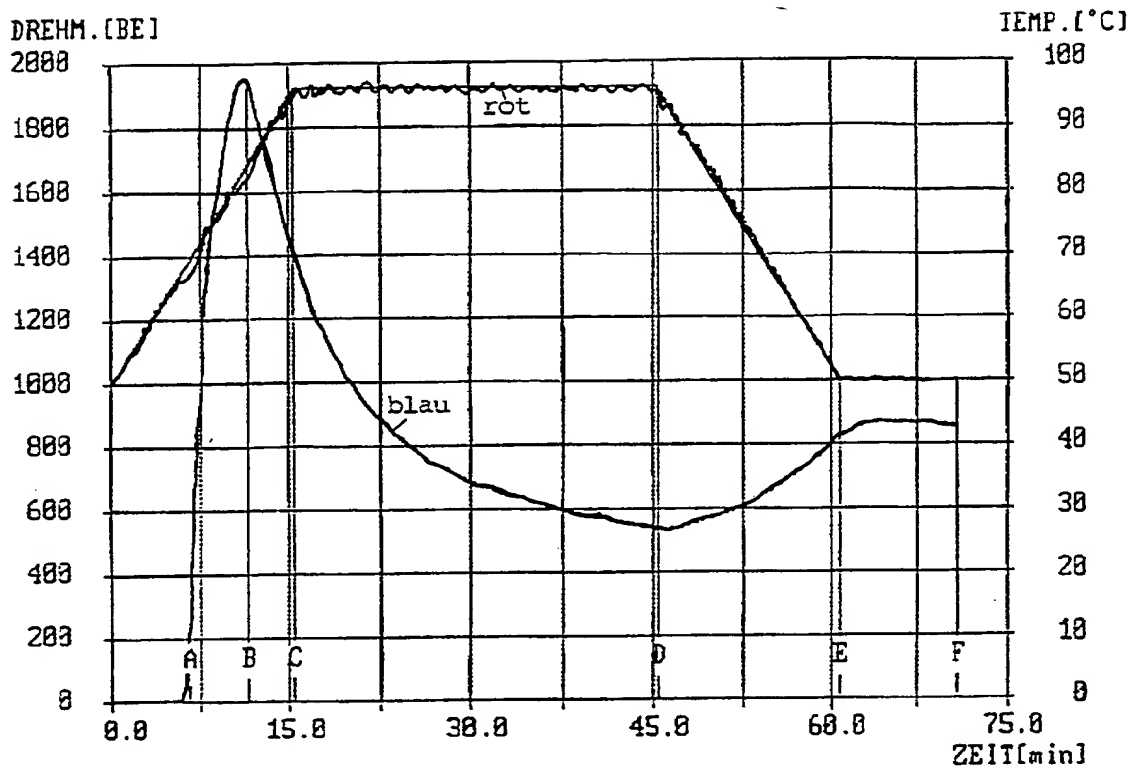
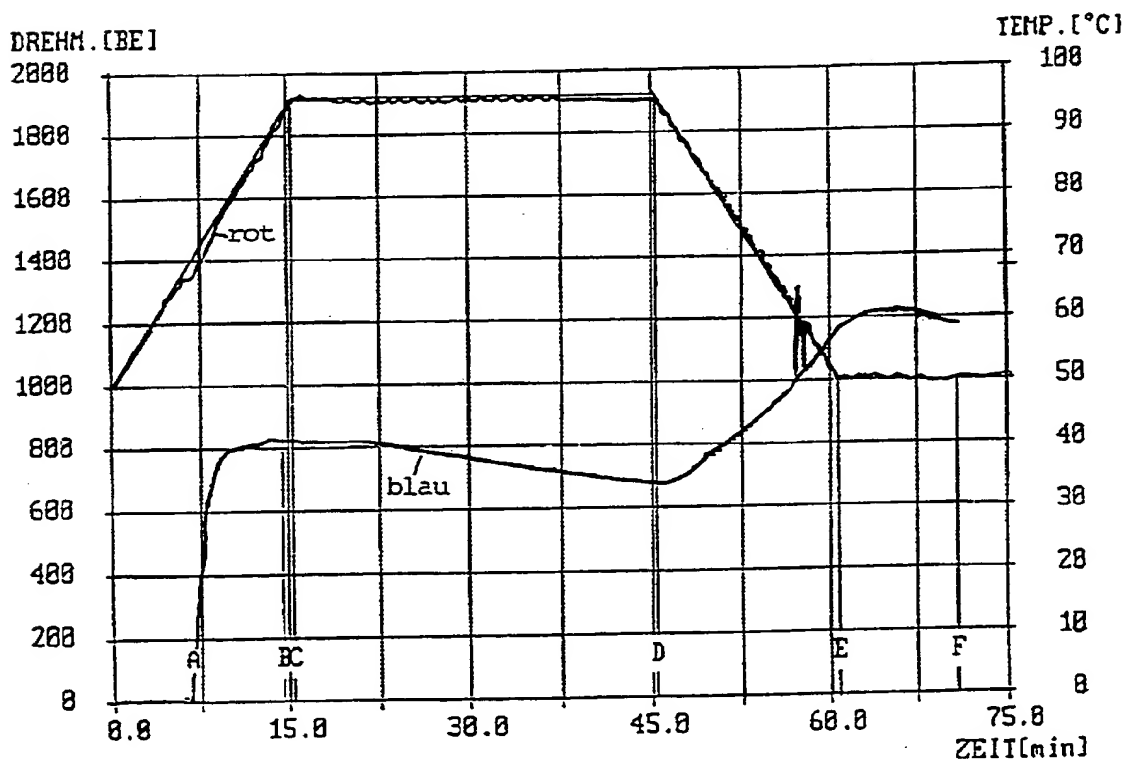


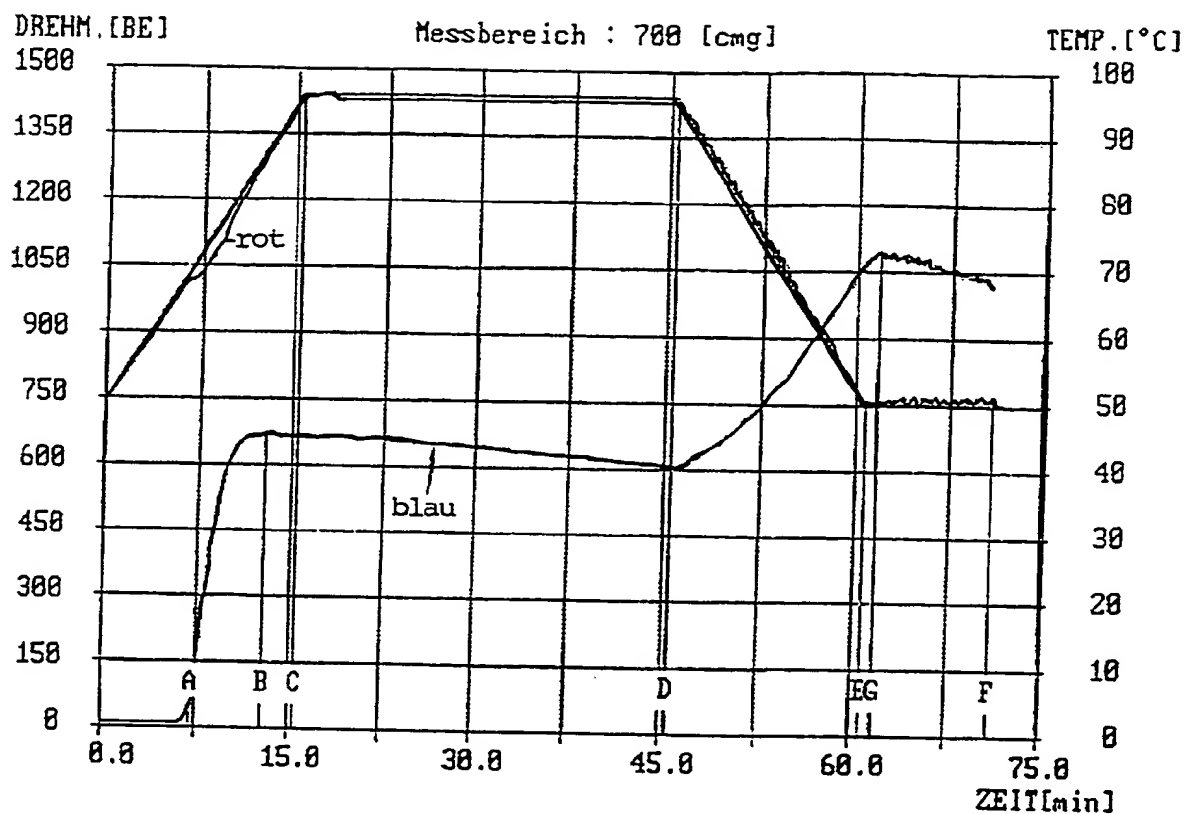
Fig. 2



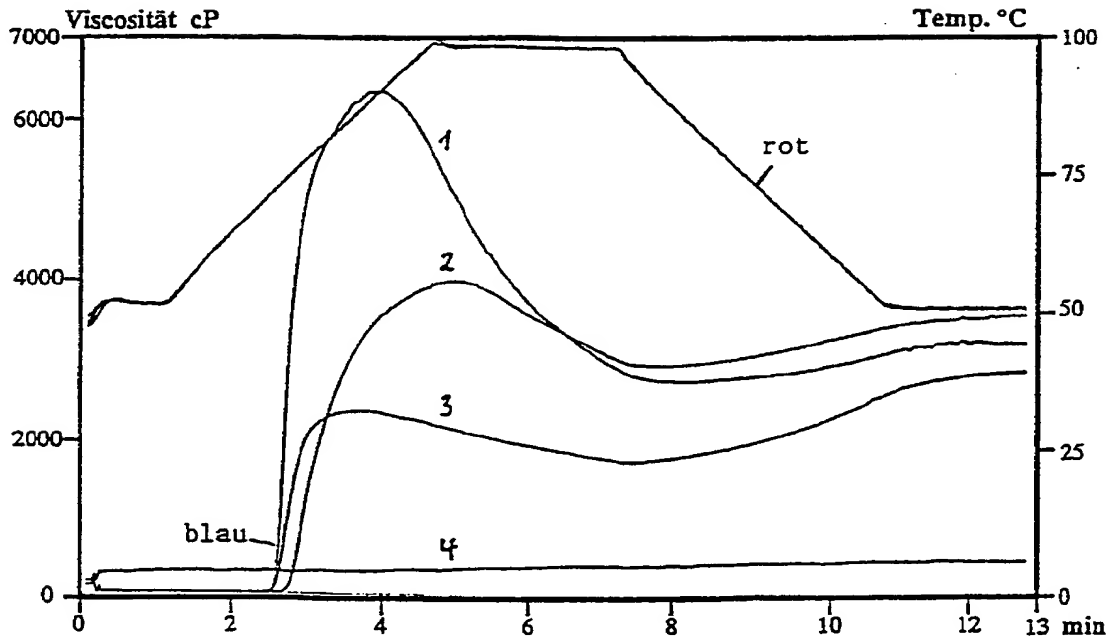
Figur 3



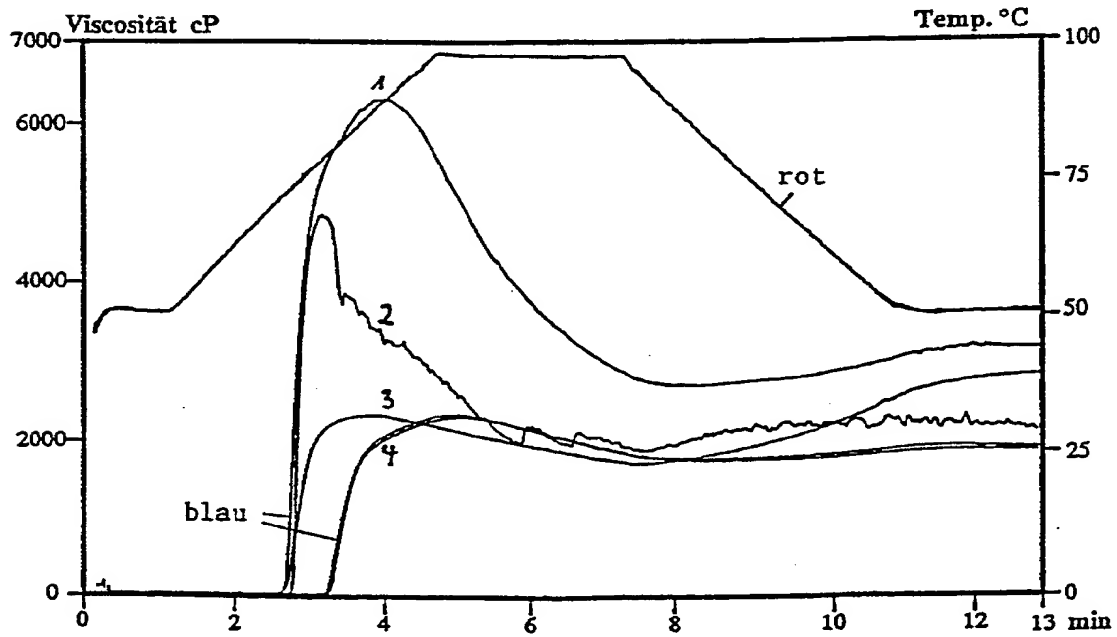
Figur 4



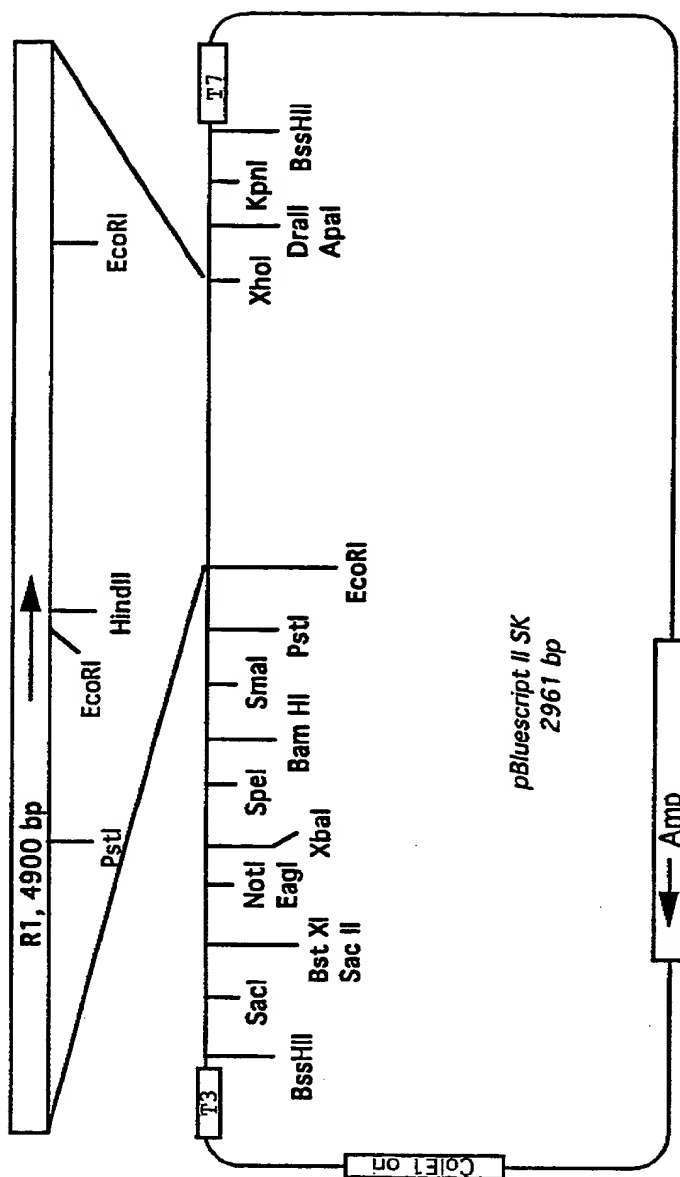
Figur 5



Figur 6



Figur 7



Figur 8